

**Die biochemische Charakterisierung
und die physiologische Bedeutung der
FDP-aktivierbaren Laktatdehydrogenasen
bei Staphylokokken und Mikrokokken**

Friedrich Götz
—

1977
—

Die biochemische Charakterisierung und die physiologische
Bedeutung der FDP-aktivierbaren Laktatdehydrogenasen bei
Staphylokokken und Mikrokokken

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

München

vorgelegt

von

Friedrich Götz

aus

München

Juli 1977



1. Berichterstatter: Prof.Dr.K.H.Schleifer
2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rüdiger

Tag der Einreichung der Arbeit: 5.10.1977

Tag der mündlichen Prüfung: 2.12.1977

Verwendete Abkürzungen:

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AK	Acetatkinase
AMP, ADP, ATP	Adenosinmono(di-, tri-)phosphat
BPB	Bromphenolblau
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
DTE	Dithioerythrit
E	Extinktion
FDP	Fructose-1,6-Diphosphat
FDH	Formiatdehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
K _m	Michaeliskonstante
LDH	Lactatdehydrogenase
LB	Lineweaver-Burk
MG	Molekulargewicht
MM	Michaelis-Menten
NAD ⁺	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert)
NADH/H ⁺	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert)
NG	Naßgewicht
n _H	Hill-Koeffizient
OD	Optische Dichte
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
TG	Trockengewicht
TIM	Triosephosphat-Isomerase

Inhaltsverzeichnis

Seite:

A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	7
1. <u>Organismen</u>	7
2. <u>Nährmedien</u>	8
2.1. Flüssigkeitsmedium	8
2.2. Agar	8
3. <u>Stammhaltung und Anzucht</u>	9
4. <u>Ernten der Zellen</u>	9
5. <u>Aufschluß der Zellen und Gewinnung des zellfreien Extraktes</u>	10
6. <u>Reinigungsschritte bei der Enzymanreicherung</u>	10
6.1. Ammoniumsulfatfällung	10
6.2. Säulenchromatographie mit Ecteola-Cellulose-Ionenaustauscher	11
6.3. Affinitätschromatographie	11
6.3.1. Prinzip	11
6.3.2. Aktivierung der Sepharose mit Bromcyan ...	11
6.3.3. Kopplung von 1,6-Diaminohexan als Brückenglied	12
6.3.4. Herstellung des Oxamatderivates	13
6.3.5. Farbstest mit Na-2,4,6-Trinitrobenzolsulfonat (TNBS)	13
6.3.6. Isolierung der FDP-aktivierbaren L-LDH von S.epidermidis ATCC 14990	14
7. <u>Trennung von D- und L-LDH aus S.aureus ATCC 12600 mittels Affinitätschromatographie</u>	16
8. <u>Dialyse</u>	16
9. <u>Ultrafiltration und Diafiltration</u>	16

10.	<u>Molekulargewichtsbestimmung</u>	17
10.1.	Sephadex-Gelfiltration	17
10.2.	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifuga- tion (SDZ)	18
10.3.	SDS-Elektrophorese	20
11.	<u>Diskelektrophorese</u>	22
11.1.	Reagenzien	23
11.2.	Herstellung des Trenngels	23
11.3.	Vorlauf	24
11.4.	Probenlösung	24
11.5.	Elektrophoreselauf	24
11.6.	Entwicklerlösungen	25
11.7.	Reaktionsablauf bei der Aktivitätsfärbung	26
12.	<u>Proteinbestimmung nach Folin-Ciocalteus</u> .	26
12.1.	Reagenzien	26
12.2.	Ausführung	27
12.3.	Eichkurve	27
13.	<u>Milchsäurebestimmung</u>	27
13.1.	Prinzip	27
13.2.	Reagenzien	28
13.3.	Ausführung	28
13.4.	Berechnung der Milchsäurekonzentration ..	29
14.	<u>Bestimmung von Fructose-1,6-Diphosphat</u> ..	29
14.1.	Prinzip	29
14.2.	Reagenzien und Lösungen	29
14.3.	Testansatz für Halbmikroküvette	30
14.4.	Eichkurve für FDP	30
15.	<u>Bestimmung von Acetat</u>	30
15.1.	Prinzip	30
15.2.	Reagenzien und Testansatz	31
15.3.	Berechnung der Acetat-Konzentration	31
16.	<u>Bestimmung von Äthanol</u>	32
16.1.	Testansatz	32
16.2.	Berechnung der Äthanolkonzentration	32

17.	<u>Bestimmung von Formiat</u>	32
17.1.	Testansatz	33
17.2.	Bestimmung der Formiatkonzentration	33
18.	<u>Bestimmung der Laktatracemase-Aktivität</u> ...	33
18.1.	Testansatz	34
19.	<u>Präparation des Zellextraktes für FDP-</u> <u>Pool-Bestimmung</u>	34
19.1.	Glucoseabbau in gepufferter Zellsuspension	34
19.2.	Membranfiltermethode	35
19.3.	Übersicht über das Aufschlußverfahren	36
20.	<u>Bestimmung von freiem anorganischem Phos-</u> <u>phat</u>	36
20.1.	Vorbereiten der Proben	37
20.2.	Fällung von anorganischem Phosphat als $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	37
21.	<u>Glucosebestimmung</u>	38
22.	<u>Bestimmung des Trockengewichtes (TG)</u>	39
23.	<u>Standardtest zur Aktivitätsbestimmung der</u> <u>FDP-aktivierbaren L-LDH</u>	39
23.1.	Reaktion von Pyruvat zu Laktat	39
23.2.	Reaktion Laktat zu Pyruvat	40
23.3.	Enzymaktivität	40
C.	<u>Ergebnisse</u>	41
I.	<u>Übersicht über die Laktatproduktion, der</u> <u>elektrophoretischen Beweglichkeit von D-</u> <u>und L-Laktat-Dehydrogenasen und deren</u> <u>biochemischen Merkmalen bei verschiedenen</u> <u>Staphylokokkenarten</u>	41
1.	Bildung von D- und L-Laktat bei verschie- denen Staphylokokken	41
2.	Elektrophoretische Beweglichkeit der NAD- abhängigen LDHs	43

3.	Physiologische und enzymatische Untersuchungen zur Bildung von D- und L-Laktat bei <i>S. aureus</i> ATCC 12600	50
3.1.	Bildung von D- und L-Laktat während des Wachstumsverlaufs	50
3.2.	Isolierung und Charakterisierung der NAD-abhängigen D- und L-LDH von <i>S. aureus</i> ATCC 12600	50
II.	<u>Reinigung und Untersuchung biochemisch-physikalischer Eigenschaften der FDP-aktivierbaren L-LDH von <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990</u>	55
4.	Untersuchung der Stabilität der FDP-aktivierbaren L-LDH	55
4.1.	Einfluß von Puffer, pH, FDP und hochkonzentrierten Lösungen auf die Erhaltung der Stabilität	55
4.2.	Verdünnungseffekt	58
5.	Reinigung der FDP-aktivierbaren LDH durch Affinitätschromatographie	59
5.1.	Plattengelelektrophorese	61
6.	Aktivierung der LDH durch FDP	62
6.1.	Restaktivität im zellfreien Extrakt ...	62
6.2.	Aktivatorspezifität	64
7.	Kosubstrat- und Substratspezifität	64
8.	pH-Optimum	66
9.	Molekulargewichtsbestimmungen	67
9.1.	Säulenchromatographie mit Sephadexgel G 200	67
9.2.	Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese	69
9.3.	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDZ)	70
9.3.1.	SDZ in Gegenwart von FDP und NADH/H^+ ...	70

9.3.2.	SDZ in Abwesenheit von FDP und NADH/H^+	72
9.3.3.	SDZ bei pH 2,0 und pH 8,5	74
10.	Temperatur-Optimum	76
11.	Das kinetische Verhalten der LDH	78
11.1.	Reaktion der L-LDH mit FDP (FDP-Variation)	79
11.1.1.	FDP-Sättigungskurve	79
11.1.2.	Darstellung nach Lineweaver und Burk (FDP)	81
11.1.3.	Die Hill-Auftragung (FDP)	81
11.2.	Einfluß von FDP auf die Zeit-Umsatz-Kurve	82
11.3.	Reaktion der LDH mit NADH/H^+ (NADH/H^+ -Variation)	85
11.3.1.	NADH/H^+ -Sättigungskurve	85
11.3.2.	Darstellung des Hemmechanismus von ADP nach Lineweaver und Burk	85
11.3.3.	Hemmung der L-LDH-Aktivität durch Nukleotidphosphate	86
11.3.4.	Die Hill-Auftragung (NADH/H^+)	88
11.4.	Reaktion der L-LDH mit Pyruvat	89
11.4.1.	Pyruvat-Sättigungskurve	89
11.4.2.	Lineweaver-Burk-Diagramm und Hemmung der L-LDH-Aktivität durch Oxamat	89
11.4.3.	Die Hill-Auftragung (Pyruvat)	91
11.4.4.	Der Einfluß von L-Laktat und NAD^+ auf die Pyruvatreduktion der FDP-aktivierbaren L-LDH von S. epidermidis	91
12.	Der Einfluß von anorganischem Phosphat auf die L-LDH-Aktivität	92
13.	Einfluß der Liganden auf die Hitzeaktivierung der L-LDH	94

III.	<u>Die FDP-aktivierbaren L-LDHs von Mikro-</u> <u>kokken- und von S. intermedius-Stämmen ..</u>	95
14.	Elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDHs von verschiedenen S. intermedius- Stämmen	95
14.1.	pH-Optimum	97
14.2.	Temperaturstabilität	97
15.	Die FDP-aktivierbaren L-LDHs von M.kristi- nae ATCC 27570 und M. varians CCM 884 ...	100
IV.	<u>Die physiologische Bedeutung der Regula-</u> <u>tion der L-LDH-Aktivität durch FDP bei</u> <u>Staphylokokken</u>	101
16.	Der Einfluß der intrazellulären FDP-Kon- zentration auf die FDP-Aktivierbarkeit der L-LDH im zellfreien Extrakt	102
17.	Der Abbau von Glucose unter anaeroben und aeroben Bedingungen durch eine gewaschene, nicht wachsende Zellsuspension von S. epidermidis ATCC 14990	105
D.	Diskussion	109
E.	Zusammenfassung	132
	Literaturverzeichnis	136

A. EINLEITUNG

Jacques Monod, der zu den namhaften Naturwissenschaftlern unserer Zeit zählt, schreibt in seinem Buch "Zufall und Notwendigkeit": "Würden wir die gegenwärtigen Erkenntnisse über den Zellmetabolismus in einer Übersicht zusammenstellen, so würde eine einfache Überprüfung genügen, um uns erraten zu lassen, daß selbst wenn Enzyme in jedem Abschnitt ihre Aufgabe perfekt erfüllen würden, die Gesamtsumme ihrer Tätigkeiten nur zum Chaos führen könnte, wären sie nicht irgendwie voneinander abhängig, um ein kohärentes System zu bilden".

Die Regulation des Zellmetabolismus durch Veränderung der Enzymaktivität zielt darauf ab, daß die Stoffwechselleistungen einzelner Enzymsysteme sinnvoll und ökonomisch koordiniert werden. Dieser Kontrollmechanismus dient dazu, die Nährstoffe der Zelle sparsam zu verwerten und gleichzeitig eine Überproduktion an Intermediärverbindungen zu verhindern.

Für die grundlegenden Steuerungsprozesse sind spezielle Enzyme verantwortlich, die chemische Information wahrnehmen und sinnvoll verarbeiten können. Als Informationsüberträger dienen dabei in den meisten Fällen Intermediärverbindungen des Stoffwechsels, sogenannte Effektoren, die durch Konzentrationsänderungen den regulierbaren Enzymen Stoffwechseländerungen signalisieren. Effektoren können aktivierend (Aktivator) oder hemmend (Inhibitor) auf die Aktivität des entsprechenden Enzyms wirken.

Die wirkungsvollste und am besten untersuchte Kontrolle der Stoffwechselregulation üben die allosterischen Enzyme aus. Der Begriff "allosterisch" ist aus dem Griechischen abgeleitet (alloios = andersartig, verschieden; stereos = räumlich ausgedehnt) und bedeutet, daß das Enzym neben dem aktiven Zentrum - räumlich getrennt - auch noch ein weiteres Zentrum besitzt. Das aktive Zentrum ist die Bindungsstelle des Substrats und das allosterische Zentrum die des Effektors. Allosterische Enzyme besitzen folgende charakteristische Eigenschaften:

- a) Sie zeichnen sich durch den Besitz eines allosterischen Zentrums aus,
- b) sie sind im Stoffwechsel fast immer an wichtigen Verzweigungspunkten anzutreffen,
- c) sie weisen - im Diagramm Reaktionsgeschwindigkeit gegen Effekorkonzentration - sigmoide Kinetik auf.
- d) In der Regel bestehen sie aus zwei oder mehr Untereinheiten.
- e) Im Hill-Diagramm ist die Steigung n entweder kleiner oder größer als 1. n ist dabei ein Maß für die Wechselbeziehungen zwischen den Bindungszentren.

Bei den Prokaryonten sind die enzymatischen Kontrollmechanismen differenzierter und zahlreicher als bei den Eukaryonten. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß bei den Prokaryonten noch eine grobe Kompartimentierung durch Zellorganellen wie z.B. Mitochondrien fehlt. Während also bei den Eukaryonten der Citrat-Zyklus und die Atmungskette räumlich getrennt von der Glycolyse ablaufen, ist bei Prokaryonten diese räumliche Trennung noch nicht in diesem Ausmaß durchgeführt. Gerade dadurch aber werden mehr Regulationsmechanismen notwendig.

Manche Regulationsmechanismen dieser phylogenetisch alten Organismen haben sich trotz veränderter Umweltbedingung bis in unsere Zeit erhalten und wir wissen in vielen Fällen noch nicht, ob und welchen Sinn diese Relikte in der jetzigen, veränderten ökologischen Situation haben.

Die FDP-aktivierbare, NAD-abhängige L(+)-LDH (EC 1.1.1.27) stellt vermutlich ein solches Relikt dar, da sie bei höheren Organismen bisher nicht gefunden werden konnte.

Wolin (1964) war der erste, der von einer FDP-aktivierbaren L-LDH bei Streptokokken berichtete. Seit dieser Zeit wurde in den verschiedensten Bakteriengruppen eine FDP-aktivierbare L-LDH entdeckt und genauer untersucht. Außer bei den bereits erwähnten Streptokokken (Wittenberger und Angelo, 1970; Brown und Wittenberger, 1972; Jago et al., 1971; Jonas et al., 1972; Mou et al. 1972) wurde dieses Enzym auch bei Bifidobakterien (de Vries und Stouthamer, 1968; Lauer, 1974), bei *Acholeplasma leidlawii* (Neimark und Tung, 1973), bei Laktobazillen (de Vries et al., 1970; Stetter, 1973; Holland und Pritchard, 1975), bei Staphylokokken (Schleifer und Kocur, 1973) und bei Mikrokokken (diese Arbeit) gefunden.

Vom Regulationsmechanismus her gesehen gehören die FDP-aktivierbaren L-LDHs zu jener Gruppe von regulierbaren Enzymen, die durch eine Vorstufe oder sogenannten "Prekursor" aktiviert werden. Die Vorstufe ist dabei das Produkt einer mehr oder weniger weit zurückliegenden Enzymreaktion. Als relativ häufiger Sonderfall kann das Substrat des regulierbaren Enzyms gleichzeitig auch Aktivator sein.

Diese Vorstufenaktivierung wurde zuerst von Leloir und Mitarbeitern (1959 und 1960) entdeckt. Sie konnten zeigen, daß die Glycogensynthetase aus Leber durch Glucose-6-Phosphat - einer Vorstufe des Glycogen - aktiviert wird. Eine Besonderheit der durch Vorstufen aktivierbaren Enzyme ist, daß sie unter physiologischen Bedingungen eine irreversible Reaktion katalysieren (Sanwal, 1970).

Mit zunehmender Forschung und Erkenntnis auf dem Gebiet der Vorstufenaktivierung hat sich herausgestellt, daß Fructose-1,6-Diphosphat (FDP) eine Schlüsselfunktion ausübt. FDP hat dabei generell die Funktion eines Aktivators.

Das Ziel dieser Arbeit war, die physikalischen und biochemischen Merkmale der FDP-aktivierbaren L-LDH genauer zu untersuchen. Obgleich auch bei S. intermedius und bei M. kristinae und M. varians eine FDP-aktivierbare L-LDH entdeckt wurde, galt das Hauptaugenmerk unserer Untersuchung der FDP-aktivierbaren L-LDH aus S. epidermidis ATCC 14990.

Da bisher völlig unklar war, welche physiologische Bedeutung die FDP-aktivierbare L-LDH besitzt, wurde auch dieser Aspekt einer genaueren Untersuchung unterzogen. Für die Beurteilung der physiologischen Rolle der FDP-aktivierbaren L-LDH lag ein Vergleich mit nicht FDP-aktivierbaren LDHs nahe.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, zur Klassifizierung der Gattung Staphylococcus beizutragen.

Staphylokokken gehören zur Familie der Micrococcaceae. In der medizinischen Mikrobiologie spielen sie eine wichtige Rolle als Eitererreger und Toxinbildner und können dadurch die verschiedensten Erkrankungen auslösen. Von der Ökologie her gesehen sind Staphylokokken stets in der näheren Umgebung von Mensch und Tier anzutreffen. Besonders häufig sind die Haut und die Schleimhäute besiedelt. Mit der Besiedelung ist jedoch nicht immer eine Staphylokokkeninfektion verbunden, da der Mensch im allgemeinen eine natürliche Widerstandsfähigkeit gegenüber den meisten pathogenen Staphylokokken besitzt. Bei Resistenzverminderung jedoch kann es leicht zu einer Infektion kommen.

Staphylokokken sind morphologisch einheitlich und lassen sich nur biochemisch oder serologisch unterscheiden. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" von 1974 ist die Gattung Staphylococcus in 3 Arten unterteilt: S. aureus, S. epidermidis und S. saprophyticus. Als Kriterium für die Pathogenität am Menschen wurde bis vor kurzem die Koagulasebildung angesehen, welche früher nur bei S. aureus, neuerdings aber auch bei S. intermedius (Hajek, 1976) nachgewiesen wurde.

Es mehren sich jedoch in letzter Zeit medizinische Berichte, daß auch koagulasenegative Staphylokokkenstämme Infektionskrankheiten verursachen können. Diese Entwicklung machte es notwendig, auch koagulasenegative Staphylokokken eingehender zu untersuchen. Schleifer und Kloos haben deshalb in ihren Arbeiten koagulasenegative Staphylokokken näher charakterisiert und aufgrund dieser Ergebnisse eine weitere Unterteilung der beiden Arten S. epidermidis und S. saprophyticus vorgeschlagen (Kloos und Schleifer, 1975a; Schleifer und Kloos, 1975a).

In unserer Arbeit wurde die Bildung der Laktatisomeren bei den Typenstämmen der von Schleifer und Kloos vorgeschlagenen Staphylokokken untersucht. Daneben wurde auch noch besonderer Wert auf die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen NAD-abhängigen LDHs gelegt.

Gleichzeitig untersuchten wir auch, welche Enzyme für die Bildung von D- und L-Laktat bei S. aureus verantwortlich sind. Hierüber waren bisher in der Literatur keine einheitlichen Angaben zu finden. So berichteten Stockland und San Clemente (1968) von zwei bis vier verschiedenen elektrophoretischen Formen der LDH bei S. aureus-Stämmen und vermuteten, daß es sich hierbei um Isoenzyme handelte. Sie verwendeten dabei D- und L-Laktat gleichzeitig als Substrat und konnten somit nicht zwischen der stereospezifischen D- und L-Form der LDH unterscheiden.

Garrard und Lascelles (1968) kamen dagegen zu dem Schluß, daß nur eine physiologisch signifikante Form der NAD-abhängigen LDH bei den von ihnen untersuchten S. aureus-Stämmen vorliegt. Ein Jahr später kamen dann Stockland und San Clemente (1969) zu der Ansicht, daß die Bildung beider Laktatisomeren bei S. aureus PS 6 auf das Zusammenwirken einer NAD-abhängigen L-LDH und einer Laktat-Racemase beruht.

Eine zuverlässige Antwort, auf welchem Weg die Laktatisomere gebildet werden, konnte bisher nicht gegeben werden. Dieses Problem wurde aufgegriffen und in der vorliegenden Arbeit untersucht.

B. MATERIAL und METHODEN

1. Organismen

Die Untersuchungen wurden an Mikroorganismen durchgeführt, die den beiden Gattungen Staphylococcus und Micrococcus angehören. Tabelle 1 enthält Herkunft und Bezeichnung der untersuchten Stämme.

Tabelle 1:

Gattung	Species	Herkunft	Stammbezeichnung
<u>Staphylococcus</u>			
S.	aureus	ATCC	12600
S.	aureus	CCM	2570
S.	warneri	ATCC	27836
S.	haemolyticus	DSM	20263
S.	hominis	ATCC	27844
S.	capitis	ATCC	27840
S.	cohnii	DSM	20260
S.	epidermidis	ATCC	14990
S.	intermedius	CCM	5739
S.	intermedius	Hajek	H2, H4, H5, H13, H14, H16, H17, H20, H23, H47, H53; P5, P12; L1, L5; K15, K57;
S.	saprophyticus	CCM	883
S.	simulans	ATCC	27848
S.	xylosus	DSM	20267
<u>Micrococcus</u>			
M.	kristinae	ATCC	27570
M.	varians	CCM	884

Die Buchstaben H, P, L und K symbolisieren die einzelnen Biotöpe, aus denen die jeweiligen Stämme isoliert wurden. Die H-Stämme wurden aus der vorderen Nasenhöhle von Tauben und die P-, L- und K-Stämme aus der gleichen Region bei Hunden (P), Nerzen (L) und Pferden (K) isoliert.

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.
CCM	Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno, CSSR.
Hajek	Dr.V.Hajek, Palacky University, Olomouc, CSSR.

2. Nährmedien

2.1. Flüssigkeitsmedium

Zur Anzucht der Mikroorganismen wurde ein Hefe-Dextrose-Medium verwendet, das sich wie folgt zusammensetzt:

10 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)
5 g D-Glucose
5 g Hefeextrakt (Merck)
5 g NaCl
1 l H₂O dest.

Das pH dieses Mediums wurde mit NaOH konz. auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde das Medium 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

2.2. Agar

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Flüssigkeitsmedium 1,5 % Agar (Oxoid) zugesetzt und in der gleichen Weise, wie oben beschrieben, durch Autoklavieren sterilisiert.

3. Stammhaltung und Anzucht

Die Bakterienstämme wurden auf Hefe-Dextrose-Schrägagar bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und alle 4 Wochen überimpft. Von dieser Stammkultur ausgehend wurden 30 ml Hefe-Dextrose-Medium in 100 ml Erlenmeyerkölbchen beimpft und 12 Stunden aerob unter Schütteln bebrütet; Staphylokokken wurden bei 37°C und Mikrokokken bei 30°C bebrütet.

Die Massenzucht erfolgte normalerweise unter anaeroben Bedingungen (stehend) in 10 oder 15-Liter-Kolben, die so weit mit Medium gefüllt waren, daß nur ein geringer Luftraum vorhanden war. Dieses Medium wurde 2 %ig mit einer Übernacht-Schüttelkultur angeimpft. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm in einem Eppendorf-Photometer verfolgt. Gleichzeitig ist auch die Ansäuerung des Mediums durch pH-Messung kontrolliert worden. Die Bebrütungsdauer war abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Organismen. In der Regel wurden die Zellen am Ende der logarithmischen Phase geerntet. Vor Ernten der Zellen wurden zur Reinheitskontrolle die Organismen mikroskopisch untersucht und ein Verdünnungsausstrich auf Agarplatte angefertigt. Gelegentlich wurde auch eine Zellwandanalyse nach Schleifer und Kandler (1972) durchgeführt.

4. Ernten der Zellen

Gegen Ende der logarithmischen Phase, nach ungefähr 8-20-stündiger Bebrütung, wurden die Zellen in einer Kühlzentrifuge (WKF) bei 12000 x g abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit H₂O, das 0,04 % Mercaptoäthanol (Merck) enthielt, gewaschen und erneut abzentrifugiert. Dieses Zellsediment wurde gewogen, und das sogenannte 'Naßgewicht' diente zum Vergleich der einzelnen Zellausbeuten. Entweder wurde nun das Sediment sofort aufgeschlossen oder bis zu seiner Weiterverwendung eingefroren.

5. Aufschluß der Zellen und Gewinnung des zellfreien Extraktes

Die Zellen wurden mittels Glasperlen, die einen Durchmesser von 0,17-0,18 mm hatten, in einer Zelmühle (Bühler) aufgeschlagen. Der Zellaufschluß erfolgte unter Wasserkühlung und dauerte etwa 15 Minuten. Anschließend wurden Zellreste und Zellsaft von den Glasperlen durch Absaugen mittels einer G-1-Fritte (Schott) getrennt. Zum Absaugen wurde normalerweise 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, verwendet oder in bestimmten Fällen auch 50 mM Imidazolpuffer, pH 6,5. Der Puffer enthielt stets 0,04 % Mercaptoäthanol. Zellwand und Zellpartikel wurden zunächst für 20 Minuten bei 48 000 x g in einer Sorvallzentrifuge (RC5) abzentrifugiert. Da sich jedoch herausgestellt hatte, daß der Überstand noch einen relativ hohen Anteil an Zellpartikeln enthielt, wurde dieser noch einmal in einer Ultrazentrifuge (Beckman L 50) 1 Stunde bei 195 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand des letzten Zentrifugats wird hier als 'zellfreier Extrakt' bezeichnet.

6. Reinigungsschritte bei der Enzymanreicherung

6.1. Ammoniumsulfatfällung (Green und Hughes, 1955)

Der zellfreie Extrakt wurde unter Eiskühlung und langsamem Rühren mit feinzerriebenen Ammoniumsulfat versetzt. Während der Fällung wurde der pH-Wert mit 5 %iger Ammoniaklösung konstant auf 6,5 eingestellt. Nach Erreichen der jeweiligen Endkonzentration der einzelnen Fällungsschritte wurde noch 1 Stunde lang gerührt und anschließend das ausgefällte Protein in einer Sorvallzentrifuge 20 Minuten bei 48 000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die LDH wurde normalerweise zwischen 50-70 % Ammoniumsulfat ausgefällt. Dieses Sediment wurde mit wenig 50 mM Imidazolpuffer in Lösung gebracht und nach Dialyse dem nächsten Reinigungsschritt unterworfen.

6.2. Säulenchromatographie mit Ecteola-Cellulose-Ionenaustauscher

10 g Ecteola-Cellulose (Serva) wurden 30 Minuten mit 250 ml 0,5 N HCl und anschließend mit der gleichen Menge 0,5 N NaOH vorbehandelt. Nach der Säure- bzw. Basenbehandlung wurde das Gel solange mit H_2O dest. gewaschen, bis es nur noch leicht sauer bzw. basisch reagierte. Das Äquilibrieren erfolgte mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,5. Zur Isolierung der LDHs wurde ein 0-0,4 M KCl-Gradient verwendet. Das Eluat wurde fraktioniert (80 Tropfen/Fraktion).

6.3. Affinitätschromatographie

Die Herstellung des Gels und die Durchführung der Affinitätschromatographie erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von Cuatrecasas (1972) und O'Cara und Barry (1972).

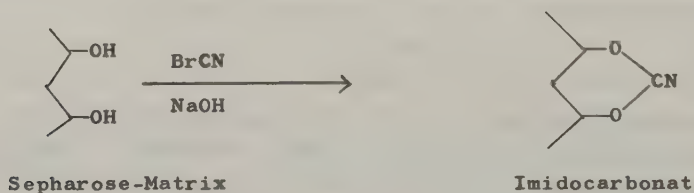
6.3.1. Prinzip

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht darauf, daß 2 zusammengehörende Partner sich erkennen und miteinander in Wechselwirkung treten. Einer der beiden Partner ist dabei an eine Matrix gebunden (immobilisiert). Bei der Isolierung der L-LDH ist der eine Partner das Enzym selbst und der andere Partner kann ein Effektor (Inhibitor bzw. Aktivator), das Cosubstrat NAD oder das Substrat (Pyruvat bzw. Laktat) sein. Nach der Methode von O'Cara und Barry dient Oxamat als reaktive, trägergebundene Gruppe. Oxamat ist ein Analogon zu Pyruvat und wird von der L-LDH in Anwesenheit von $NADH/H^+$ zwar gebunden, kann aber nicht reduziert werden. Als Trägergel dient ein Zuckerpolymer (Sepharose 4 B), an welches über ein Diamino-Brückenglied Oxalsäure gekoppelt wird, wodurch das endständige Oxamatderivat entsteht.

6.3.2. Aktivierung der Sepharose mit Bromcyan

5 g gepackte Sepharose 4 B wurden mit H_2O dest. gewaschen, dekantiert und mit 5 ml H_2O dest. aufgenommen. Anschließend

wurden 1,5 g BrCN (300 mg/ml gepackte Sepharose) unter Rühren in die Suspension gegeben. Das pH wurde durch Titration mit 2 N NaOH solange auf 11,0 eingestellt, bis die Freisetzung von Protonen aufgehört hatte. Die Temperatur war durch Zugabe von Eis auf ca. 20°C gehalten worden. Durch diese Bromcyanaktivierung wurde die Sepharose in eine aktivierte Form überführt, welche mit primären Aminogruppen unter bestimmten Bedingungen eine kovalente Bindung eingeht.



6.3.3. Kopplung von 1,6-Diaminohexan als Brückenglied

Um eine ausreichende Annäherung der L-LDH an das gebundene Oxamat zu ermöglichen, wurde Oxalat über ein Brückenglied ('Spacer') an Sepharose gekoppelt.

Die mit Bromcyan aktivierte Sepharose wurde rasch auf einer G-1-Fritte mit 500 ml kaltem 0,1 M Na-Boratpuffer, pH 9,5, gewaschen und sofort in die 1,6-Diaminohexanlösung überführt, worauf dieses Gemisch nun 20 Stunden bei 4°C gerührt wurde (Glasrührer). Das sehr alkalisch reagierende 1,6-Diaminohexan (2 mMol/ml gepackte Sepharose) war vorher in 5 ml 0,5 M Na-Boratpuffer, pH 9,5, gelöst worden.

Da die bromcyan-aktivierte Sepharose sehr instabil ist, mußten das Waschen und die Zugabe von 1,6-Diaminohexan sehr rasch erfolgen. Die ganze Prozedur sollte nicht länger als 90 Sekunden dauern. Nach 20 Stunden wurde das Gel ausgiebig mit H₂O dest. gewaschen, um das freie 1,6-Diaminohexan zu entfernen.



Dieser Farbtest reagiert spezifisch mit primären aliphatischen und aromatischen Aminen und dient als Nachweis für die Bildung der verschiedenen Sepharosederivate.

Zu 1 ml einer gesättigten Na-Tetraboratlösung wird 0,2 ml Probenmaterial (substituierte und unsubstituierte Sepharose) gegeben und mit 0,1 ml einer 3 %igen TNBS-Lösung versetzt. Nach 2 Stunden etwa ist die Reaktion beendet. Unsubstituierte Sepharose bzw. das Carboxylderivat reagieren gelb, während mit aliphatischen Aminen substituierte Sepharose einen orangen Farbkomplex bildet. Das Ausmaß der Substitution kann durch die Intensität der Farbreaktion ermittelt werden.

6.3.6. Isolierung der FDP-aktivierbaren L-LDH von S. epidermidis ATCC 14990.

In einer Säule (2 x 7 cm) mit dem hergestellten Sepharose-Oxamat-Derivat wurde die Isolierung der L-LDH bei Zimmertemperatur durchgeführt. Beladen wurde die Säule mit zellfreiem Extrakt oder mit dialysierter Ammoniumsulfatfällung (50-70 %). Um die Kapazität der Säule voll auszunutzen, wurde die Enzymlösung solange aufgetragen, bis LDH-Aktivität im Eluat auftrat. Enzymlösung und Startpuffer (50 mM, Phosphatpuffer, pH 6,2) enthielten 0,2 mM NADH/H⁺, 2 mM FDP und 2 mM Dithioerythrit; höhere NADH/H⁺-Konzentrationen hatten keinen Einfluß auf die Bindungskraft der L-LDH. Nun wurde die Säule mit Startpuffer gewaschen, um die Begleitkomponenten wegzuspülen. Bereits in diesem Stadium war ein relativ hoher Reinheitsgrad erreicht worden. Durch Zugabe von Salz im Startpuffer konnte der Reinigungseffekt erhöht werden, da dadurch unspezifisch gebundene Begleitproteine desorbiert bzw. überhaupt nicht gebunden wurden. Je höher man mit der Salzkonzentration gehen kann, ohne daß gleichzeitig auch die LDH desorbiert, umso größer ist der Reinigungseffekt. Von den verschiedenen Salzen, die getestet wurden, hat sich NH₄Cl durch seinen leicht stabilisierenden Einfluß auf die LDH am besten bewährt. Im Startpuffer konnte die NH₄-Cl-Konzentration auf 0,18 M erhöht werden, ohne eine Desorption der L-LDH zu bewirken. Jede weitere Erhöhung der Ionen-

Konzentration führte jedoch bereits zu einer schleppenden Freisetzung der L-LDH. Durch Weglassen von NADH/H^+ wurde zwar die L-LDH mit 0,18 M NH_4Cl eluiert, aber so verzögert, daß der Verdünnungsgrad sehr hoch war. Um dies zu verhindern, wurde die NH_4Cl -Konzentration auf 0,3 M erhöht. Dadurch wurde die L-LDH schnell und konzentriert eluiert. Obwohl die pH-Werte des Puffers variiert und in An- und Abwesenheit von FDP die Versuche durchgeführt wurden, war nicht eindeutig ersichtlich, ob NADH/H^+ im Startpuffer die erwartete Wirkung ausübte.

Nachdem das Säulenmaterial mit 1 M NaCl-Lösung gewaschen worden war, wurde die bereits gereinigte L-LDH ein zweites Mal aufgetragen und auf die gleiche Weise eluiert.

NADH/H^+ wird deshalb dem Startpuffer beigelegt, weil man annimmt, daß die Bindung der Liganden an die LDH in einer gesetzmäßigen Reihenfolge erfolgt. Nach Cleland (1963) kann Pyruvat erst dann von der LDH gebunden werden, wenn vorher NADH/H^+ gebunden worden ist. Von dem Enzym-Cosubstrat-Substrat-Komplex wird zuerst Laktat und erst dann NAD^+ freigesetzt. Dieser gesetzmäßige Mechanismus wird zumindest bei der Säugetier-LDH durch die Affinitätschromatographie bestätigt (z.B. Schweineherz-LDH (H_4), O'Carra und Barry, 1972). In diesem genannten Beispiel kann die NaCl-Konzentration in Gegenwart von NADH/H^+ auf 0,5 M erhöht werden, ohne daß eine Desorption der LDH erfolgt.

Dieses Ergebnis konnte mit dem selbst hergestellten Oxamaterivat bestätigt werden.

Warum nun die FDP-aktivierbare LDH von S.epidermidis ATCC 14990 nicht in der gleichen Weise gebunden wurde, könnte folgende Gründe haben :

- a) Die Assoziationskonstante der FDP-aktivierbaren LDH zu Oxamat ist sehr klein; ..
- b) Diese LDH gehorcht nicht der gesetzmäßigen Reihenfolge in der Bindung der Liganden.

In welcher Reihenfolge FDP gebunden wird, wenn überhaupt ein gesetzmäßig ablaufender Mechanismus vorliegt, ist bis jetzt noch nicht geklärt.

7. Trennung von D- und L-LDH aus S.aureus ATCC 12600 mittels Affinitätschromatographie

Während früher (Götz, 1973) die Trennung von D- und L-LDH aus Extrakten von S. aureus-Stämmen nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte und Ladungen möglich war, gelingt die Trennung mittels des Sepharose-Oxamat-Derivats mühelos und quantitativ. Im Gegensatz zur L-LDH wird die D-LDH durch Oxamat kaum gehemmt. Aus diesem Grund kann sich die D-LDH nicht an das Oxamat-Derivat binden und wird eluiert. Die L-LDH bleibt gebunden, selbst bei einer NH_4Cl -Konzentration von 0,4 M im Startpuffer.

8. Dialyse

Zur Reduzierung hoher Ionenkonzentrationen oder Entfernung niedermolekularer Substanzen (z.B. FDP) wurde die Enzymlösung mittels des Dialyseschlauchs dialysiert. Als Dialysepuffer wurden 0,05 M Imidazolpuffer pH 6,5 mit 0,04 % (v/v) Mercaptoäthanol verwendet. Die Dialysezeit mit Pufferwechsel betrug normalerweise 24 Stunden.

9. Ultrafiltration und Diafiltration

Die Konzentrierung der Enzymlösung nach säulenchromatographischer Auftrennung und Isolierung wurde in einem Ultrafiltrations-

gerät (Amicon) durchgeführt. Es wurde dazu eine Membran (PM 30, Amicon) verwendet, die nur für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 30 000 durchlässig ist.

Dieses Verfahren wurde häufig auch zur Dialyse verwendet, da mit dieser Methode die Abtrennung niedermolekularer Komponenten erheblich schneller erfolgt als mit der oben beschriebenen Methode. Es wird dabei lediglich der Ultrafiltrationszelle aus einem Druckbehälter kontinuierlich Dialysepuffer zugeführt.

10. Molekulargewichtsbestimmung

10.1. Sephadex-Gelfiltration (nach Andrews, 1965)

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde das Sephadex G 200-Gel verwendet. Die Ausschlußgrenze dieses Gels liegt bei einem MG von ungefähr 200 000.

Als Vorbehandlung wurden 16 g Sephadexpulver 5' Stunden in 2 l H₂O dest. bei Siedetemperatur gequollen. Dieses Gel wurde blasenfrei in eine 80 x 2,5 cm-Säule gegossen. Anschließend wurde das Gel 2 Tage mit Puffer gewaschen, der sich wie folgt zusammensetzt:

20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5
100 mM KCl
2 mM FDP und
0,04% (v/v) Mercaptoäthanol bzw. 2 mM DTT.

Zum Kalibrieren der Säule wurden folgende Eichsubstanzen (Boehringer, Combithek) verwendet:

Dextranblau, zur Markierung der Ausschlußgrenze
(MG 400 000);
Aldolase aus Kaninchenmuskel (MG 158 000)
Rinderserumalbumin (MG 67 000),
Ovalbumin (MG 45 000) und
Cytochrom c aus Pferdeherz (MG 12 500).

Diese Eichsubstanzen wurden in 1 ml Puffer gelöst, dem 50 mg Saccharose zum Beschweren des Gemisches beigelegt waren.

Nach Elution und Fraktionierung der Eichproteine wurde 1 ml zellfreier Extrakt zusammen mit Dextranblau, Cytochrom c und Saccharose aufgetragen. Der Elutionspuffer enthält im Falle der FDP-aktivierbaren LDH zusätzlich 0,1 mM NADH/H⁺ zur Stabilisierung des Enzyms.

Die Position von Cytochrom c und Dextranblau in den einzelnen Fraktionen wurde durch Lichtabsorption bei 546 und 578 nm in einem Eppendorf-Photometer ermittelt; die Position der restlichen Eichproteine bei 280 nm.

In einer Eichkurve wurde die Fraktionsnummer mit dem Hauptgehalt an Eichproteinen gegen den Logarithmus des MG aufgetragen.

10.2. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDZ)

Die Molekulargewichtsbestimmung mittels der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugationstechnik wurde nach Martin und Ames (1961) durchgeführt. Diese Methode der MG-Bestimmung führt zur Separation von Teilchen aufgrund unterschiedlicher Teilchengröße und Sedimentationskoeffizienten.

Die Verwendung eines schwachen, aber definierten Dichtegradienten $\frac{d\rho}{dr}$ hat lediglich den Zweck, die Flüssigkeitssäule zu stabilisieren und dadurch die Konvektion zu verhindern. Es muß dabei beachtet werden, daß die Probesubstanz eine geringere Dichte besitzt als der Gradient.

Da im Schwerfeld die Teilchen gleicher Größe und gleicher Sedimentationskoeffizienten in definierten Zonen wandern, spricht man auch von "moving zone" oder "s-zonaler Trennung".

Für die Formung des linearen 5-20 % Saccharosegradienten wurde ein Gradientenmischer verwendet. Um Aufschluß über den Einfluß des pH-Wertes auf das MG der LDH zu bekommen, wurde die Saccharoselösung in verschiedenen Puffersystemen mit unterschiedlichen pH-Werten aufgenommen. Daneben wurde auch der Einfluß von FDP, NADH/H^+ und Pyruvat auf das MG getestet durch Zugabe dieser Komponenten in die Saccharoselösung und Enzymlösung. Zur Stabilisierung des Gradienten (4 ml) wurden die Zentrifugenröhrchen mindestens 4 Stunden im Kühlschrank gelagert, bevor 0,1 ml Probenlösung aufgetragen wurde.

Als Standardprotein diente neben Ovalbumin (Mg 45 000) vor allem auch die Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Hefe mit einem MG von 142 000 (Bühner und Sund, 1969). Dieses Enzym erschien vor allem deshalb gut geeignet als Standardprotein, weil es ebenso wie die L-LDH aus 4 Untereinheiten aufgebaut ist und damit eine ähnliche Quartärstruktur besitzt.

Die Zentrifugation wurde in einer Beckman L-50 Ultrazentrifuge durchgeführt. Als Rotor wurde der Ausschwingrotor SW 56 Ti verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei 48 000 UpM. Dies entspricht einer mittleren Zentrifugalbeschleunigung von 190 000 g. Die Temperatur betrug während der 12-stündigen Zentrifugation 3°C.

Nach dem Zentrifugenlauf wurden die einzelnen Saccharosegradienten fraktioniert und die Position von LDH und ADH durch den Aktivitätstest ermittelt. In bestimmten pH-Bereichen war keine Aktivität zu erwarten. In diesen Fällen wurde gereinigte LDH verwendet und ihre Position durch die Proteinabsorption bei 280 nm bestimmt.

Die Berechnung des MG erfolgte nach der von Martin und Ames (1961) angegebenen Annäherungsformel:

$$MG_x = \left(\frac{E_x}{E_{\text{Standard}}} \right)^{3/2} \times MG_{\text{Standard}}$$

MG = Molekulargewicht

E = Zahl der Fraktionen vom Meniskus

x = unbekanntes Protein

Standard = bekanntes Protein (Ovalbumin oder ADH).

10.3. SDS-Elektrophorese

Natrium-Dodecylsulfat (SDS) wurde erstmals von Maizel (1966) in der Diskelektrophorese verwendet. Diese Methode fand bald darauf auch Anwendung in der Bestimmung des MG von Proteinen (Shapiro et al. 1967). SDS ist ein anorganisches Detergenz, welches die nativen Ladungsdifferenzen der einzelnen Proteine reduziert. In einem elektrischen Feld wandert der Protein-SDS-Komplex als Anion. Dies hat zur Folge, daß die Auftrennung dieses Komplexes in der Matrix des Polyacrylamidgels fast ausschließlich auf der Größe des MG des zu trennenden Proteins erfolgt. Zwischen der relativen Wanderungsgeschwindigkeit und dem MG des Proteins besteht eine proportionale Beziehung. SDS bewirkt weiterhin eine Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindung und der hydrophoben Bindung.

Das im Probenpuffer enthaltene Mercaptoäthanol zerstört Disulfidbrückenbindungen. Auf diese Weise werden Proteinuntereinheiten, die durch die genannten Bindungen zusammengehalten wurden, getrennt und wandern entsprechend ihres MG.

Die Elektrophorese wurde in einem Platten-Gel-Elektrophoresegerät (Hözl) durchgeführt. Die Geldicke betrug 1,5 mm. Zur besseren Auftrennung der Proteine wurde ein linearer Gradient

von 5-15 % Acrylamidgel (nach Laemmli, 1970) verwendet. Im 7,5 % Acrylamidgel lag Cytochrom c stets außerhalb der Linearität der übrigen Eichproteine.

	Acrylamidgel	
	5 %	15 %
1 M Tris HCl, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml
H ₂ O dest.	4,04 ml	1,00 ml
(10 % SDS)	0,10 ml	0,10 ml
30 % Acrylamid mit 0,8 % Bis	1,66 ml	5,00 ml
Ammoniumpersulfat (15 mg/ml)	0,30 ml	0,10 ml
Temed 5 %	0,15 ml	0,05 ml

Der Gradient wurde mittels eines 2-Kammer-Mischgefäßes hergestellt. Die einzige Abweichung von dem Laemmli-System war das Weglassen von SDS aus dem Gel. Es hat sich nämlich herausgestellt (Stocklosa und Latz, 1974), daß es vollkommen ausreicht, wenn SDS nur im Probenpuffer enthalten ist. Beide Systeme wurden getestet, ohne daß sich wesentliche Differenzen ergaben. Die Bindung zwischen SDS und Protein ist hydrophober Natur, welche auch bei einer relativ hohen Stromspannung stabil bleibt.

Der Probenpuffer setzt sich wie folgt zusammen :

10,00 ml 0,065 M Tris HCl, pH 6,8
 1,00 ml Glycerin
 0,10 ml 0,1 % Bromphenolblau
 3 % SDS
 5 % Mercaptoäthanol

Der Probenpuffer wurde 1:2 mit der gereinigten LDH-Lösung bzw. Eichproteinlösung gemischt und 3 Minuten bei 100°C

inkubiert. Der Elektrodenpuffer setzte sich zusammen aus:

3,00 g Tris
14,40 g Glycin
1,00 g SDS
in 1 l H₂O dest. gelöst, pH 8.3

Der Elektrophoreselauf wurde mit einer konstanten Stromstärke von 6 mA durchgeführt. Der Lauf dauerte dabei etwa 12 Stunden. Die jeweiligen Geltaschen wurden mit 0,5-1,0 µg Protein beladen. Als Eichproteine dienten Rinderkatalase (MG 60 000), Ovalbumin (MG 43 000), α-Chymotrypsinogen (MG 25 700) und Rinderherz-Cytochrom (MG 11 700). Die angeführten Molekulargewichte stammen aus Weber und Osborn (1969).

Ebenfalls nach diesen Autoren wurde die Anfärbung der Proteinbanden durchgeführt. Das Färbereagenset setzte sich zusammen aus 1,25 g Coomassie-Brillant-Blau, gelöst in einer Mischung aus 46 ml Eisessig und 454 ml 50 % Methanol.

Die Entfärbelösung setzte sich zusammen aus :

75 ml Eisessig
50 ml Methanol
875 ml H₂O dest.

Während die Anfärbung der Proteinbanden bei Raumtemperatur erfolgte, wurde die Entfärbung bei 50°C durchgeführt.

Zur Ermittlung des MG der LDH wurde die relative Mobilität der Proteinbanden zum Auftragungsort (linear) gegen das MG (logarithmisch) aufgetragen.

11. Diskelektrophorese

Die Diskelektrophorese wurde nach der Methode von Maurer (1971) (Gelsystem Nr.6) durchgeführt. Es gab dabei jedoch

eine wesentliche Ausnahme: Als Gelpuffer wurde der von Stetter (1973) beschriebene Glycylglycinpuffer verwendet.

11.1. Reagenzien

A) Gelpuffer:

6,60 g Glycylglycin
0,45 ml Temed
80,00 ml H₂O dest. mit 3 N NaOH auf pH 7,5 einstellen und mit H₂O dest. auf 100 ml auffüllen.

B) Acrylamidlösung:

15,00 g Acrylamid
0,40 g N'-N-Methylen-bis-acrylamid (Bis)
50,00 ml H₂O dest.

C) Katalysator:

140 mg Ammoniumpersulfat (Serva)
100 ml H₂O dest.

Kammerpuffer:

5,52 g 5'5-Diäthylbarbitursäure
1,00 g Tris
1,00 l H₂O dest. Vor Gebrauch ist dieser Puffer 1:10 mit H₂O dest. zu verdünnen.

Alle Lösungen sind mehrere Wochen bei 4°C haltbar. Lediglich der Katalysator muß stets frisch angesetzt werden.

11.2. Herstellung des Trenngels

Zur Herstellung des Trenngels wurden die Lösungen in der angeführten Reihenfolge vermischt:

2,5 ml Lösung A
5,0 ml Lösung B
2,5 ml H₂O dest.
10,0 ml Lösung C

Nach leichtem Umschwenken wurde das Gemisch in Glasröhrchen (7,0 x 0,60 cm), die unten mit Parafilm verschlossen waren,

blasenfrei eingefüllt. Die Geloberfläche wurde mit H_2O dest. überschichtet. Nach ca. 20 Minuten war das Gel polymerisiert. Das überschichtete Wasser wurde abgeschleudert und die Geloberfläche 3 x mit Kammerpuffer nachgewaschen. Der Parafilm wurde entfernt.

11.3. Vorlauf

Die obere und untere Kammer des Elektrophoresetopfes wurde mit je 1 l Kammerpuffer gefüllt. Zur Entfernung des Ammoniumpersulfats aus dem Gel wurde 30 Minuten lang eine Stromstärke von 10 mA (ca. 200 V) angelegt. Als starkes Oxidationsmittel würde Ammoniumpersulfat die Sulfhydrylgruppen oxidieren. Sind Aminosäuren mit Schwefelgruppen im katalytischen Zentrum vorhanden, so muß der Vorlauf solange ausgedehnt werden, bis BPB einmal durch das Gel gewandert ist.

11.4. Probenlösung

Der zellfreie Extrakt wurde in der Beckman-Ultrazentrifuge L-50 (Festwinkelrotor Typ 42.1) eine Stunde lang bei 195 000 g zentrifugiert und anschließend dialysiert. Von dem Dialysat wurden 0,5 ml mit ca. 30 mg Saccharose und 50 µl einer 0,1 %igen Bromphenolblaulösung versetzt. Davon wurden pro Gel 20 µl aufgetragen.

Bei einer Coelektrophorese wurde der zellfreie Extrakt zweier Stämme auf ein Gel aufgetragen.

11.5. Elektrophoreselauf

Die obere Kammer des Elektrophoresegerätes wurde an den negativen Pol des Stromversorgungsgerätes (Ortec) angeschlossen. Die Stromstärke wurde die ersten 10 Minuten auf 10 mA - bis BPB in das Gel eingedrungen war - und dann konstant auf 15 mA eingestellt. Wenn die BPB-Bande das Ende der Röhrchen erreicht hatte, war der Elektrophoreselauf beendet. Die Gele wurden mittels einer Injektionsspritze aus

den Glasröhrchen entfernt und in die bereits vorbereiteten Entwicklerlösungen gebracht.

11.6. Entwicklerlösungen

Die LDH war nach der Elektrophorese noch aktiv und wurde im Gel durch die Entwicklerlösung sichtbar gemacht.

A) Reaktion von Pyruvat zu Laktat:

Reaktionslösung:

100 mg Pyruvat

50 mg NADH/H⁺

50 mg FDP (bei FDP-aktivierbaren LDHs)

Die Gele wurden einige Minuten in der Reaktionslösung inkubiert und unter UV-Licht wurde die Entstehung der LDH-Banden beobachtet (an der Stelle, wo NAD⁺ freigesetzt wurde, war ein dunkler Schatten sichtbar). Sobald die ersten Anzeichen einer Bande auftraten, wurde das Gel gewaschen und in die Entwicklerlösung überführt.

Entwicklerlösung:

40 mg Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)

6 mg Phenazinmethosulfat (PMS)

20 ml Trispuffer 0,1 M, pH 8,6

Die Gele wurden einige Sekunden lang entwickelt und dann mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Position der LDH war durch eine farblose Bande sichtbar, der restliche Gelbereich zeigte sich dunkelviolet.

B) Reaktion von Laktat zu Pyruvat:

Reaktions- und Entwicklerlösung:

40 mg D- oder L-Laktat

40 mg NAD⁺

30 mg NBT

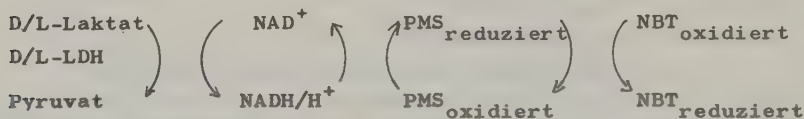
6 mg PMS

20 ml Trispuffer 0,1 M, pH 7,0.

Die Enzympositionen wurden nach 5-30 Minuten, je nach Aktivität der LDHs, als dunkelviolette Banden (reduziertes NBT) sichtbar. Nach Ausbildung der Banden wurden die Gele mit Wasser gewaschen und in Wasser bei 4°C aufbewahrt.

11.7. Reaktionsablauf bei der Aktivitätsfärbung

Bei der Aktivitätsfärbung der LDH im Gel laufen folgende Reaktionen ab :



NBT(reduziert) ist für die Blaufärbung der Bande verantwortlich. Bei der Anfärbung der Gele mit Pyruvat als Substrat läuft die Reaktion in der Gegenrichtung ab.

12. Proteinbestimmung nach Folin-Ciocalteus (Lowry et al.1951)

Der Test mit dem Folin-Ciocalteus-Reagenz ist spezifisch für die phenolische Seitenkette des Tyrosins; es bildet sich ein blaugrüner Farbstoff, dessen Intensität bei 690 nm gemessen werden kann.

12.1. Reagenzien

Lösung A:

- 1,00 ml 2,7 % Na-K-Tartratlösung
- 1,00 ml 1,0 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung
- 100,00 ml 2,0 % Na_2CO_3 -Lösung

Lösung B:

Folin-Ciocalteus-Reagenz 1:2 (1+1) wird mit H_2O dest. verdünnt.

Beide Lösungen sind frisch anzusetzen.

12.2. Ausführung

0,10 ml Proteinlösung

0,90 ml NaOH, 0,5 N

5,00 ml Lösung A

10 Minuten stehen lassen, dann sofort gut mischen und 0,50 ml Lösung B zugeben.

Nach 30 Minuten wurde die Extinktion bei 690 nm gemessen.

12.3. Eichkurve

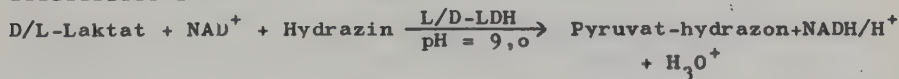
Zur Aufstellung der Eichkurve wurden 0-200 µg Protein in den Test eingesetzt und in einem Diagramm die Extinktion gegen die Proteinmenge aufgetragen.

Häufig wurde auch eine nach Hartree (1972) modifizierte Methode der Proteinbestimmung verwendet. Diese Methode ist zwar genauer, hat aber den Nachteil, daß Proben mit hoher NaOH-Konzentration (z.B. nach der HClO_4 -Fällung, s.19.1 und 2) das Ergebnis verfälschen. Bei der Lowry-Methode ist es möglich, die hohe NaOH-Konzentration auszugleichen.

13. Milchsäurebestimmung (Hohorst, 1966)

Die Menge der gebildeten Milchsäure wurde enzymatisch mit Hilfe von D- und L-LDH im optischen Test ermittelt.

13.1. Prinzip



Da das Gleichgewicht der Reaktion weit auf der Seite von Laktat und NAD^+ liegt, müssen zur quantitativen Dehydrierung von Laktat

- Pyruvat als Hydrazon aus dem Gleichgewicht entfernt,
- die Protonen durch das alkalische Reaktionsmedium abgefangen und
- ein hoher NAD^+ -Überschuß verwendet werden.

13.2. Reagenzien

- a) L-LDH aus Kaninchenmuskel (Boehringer);
- b) D-LDH wurde aus Leuconostoc mesenteroides isoliert, da die gekaufte D-LDH eine wesentlich schwächere Aktivität aufwies. Der zellfreie Extrakt von L. mesenteroides wurde einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen (50-70 %) und anschließend portionsweise eingefroren. (Die ADH-Aktivität war nach diesem Schritt stark reduziert. L-LDH-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist nach der Ammoniumsulfatfällung noch Butandiol-Dehydrogenase-Aktivität nachweisbar. Diese Butandiol-Dehydrogenase muß jedoch durch Hydroxylapatitchromatographie entfernt werden, da bei einigen Staphylokokken Butandiol gebildet wird.)
- c) Glycin-Hydrazin-Puffer pH 9,0 setzt sich wie folgt zusammen:
 - 22,80 g Glycin
 - 50,00 ml Hydrazinhydrat, ca. 24 %
 - 550,00 ml H₂O dest.
- d) NAD⁺-Lösung (30 mg/ml H₂O dest.)

13.3. Ausführung

Die Bestimmung von D- und L-Laktat wurde in getrennten Küvetten durchgeführt. Der Testansatz in der Küvette setzte sich wie folgt zusammen:

- 3,00 ml Glycin-Hydrazin-Puffer
- 0,20 ml NAD⁺-Lösung
- 0,20 ml Probe (bzw. H₂O als Leerwert)
- mischen und E₀ ablesen
- 0,02 ml D- oder L-LDH

Die Extinktionszunahme wurde bei 366 nm in einem Eppendorf-Photometer gemessen. Der Endwert war nach ca. 60 Minuten erreicht. Es wurde eine Nullküvette mitgeführt, welche statt der Probenlösung 0,20 ml H₂O dest. enthielt.

13.4. Berechnung der Milchsäurekonzentration

$$\mu\text{g Laktatisomer/ml Probelösung} = \frac{\Delta E_{\text{korr.}} \times V_{\text{Küv.}} \times \text{Verd.} \times 90}{\epsilon \times d \times V_{\text{P}}}$$

$\Delta E_{\text{korr.}}$ = Extinktionsdifferenz Probenküvette - Extinktionsdifferenz Nullküvette;

$V_{\text{Küv.}}$ = Endvolumen in der Küvette (3,42 ml)

Verd. = Verdünnungsfaktor, um den die Probe vorher verdünnt wurde

90 = Molekulargewicht der Milchsäure

d = Schichtdicke der Küvette in cm (1 cm)

V_{P} = eingesetzte Menge der Probe in (ml)

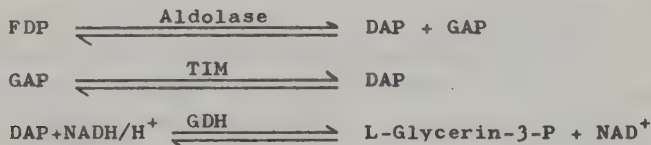
ϵ = molarer Extinktionskoeffizient von NADH/H^+ ($\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$)

$\epsilon_{366} = 3,3$, $\epsilon_{340} = 6.6$.

14. Bestimmung von Fructose-1,6-Diphosphat (FDP)

Die intrazelluläre FDP-Konzentration (FDP-Pool) wurde nach der Methode von Bücher und Hohorst (1962) bestimmt.

14.1. Prinzip



Bei NADH/H^+ -Überschuß läuft die Reaktion schnell ab. Es wird dabei die Dehydrierung von NADH/H^+ gemessen. Die damit verbundene Extinktionsabnahme wurde bei 366 nm bestimmt.

14.2. Reagenzien und Lösungen

FDP-Aldolase (EC 4.1.2.13);

Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, GDH (EC 1.1.1.8);

Triosephosphat-Isomerase, TIM (EC 5.3.1.1);

Triäthanolaminpuffer, 0,4 M, pH 7,6;

NADH/H^+ (10 mM).

14.3. Testansatz für Halbmikroküvette

- 1,00 ml Triäthanolaminpuffer
- 0,20 ml Probelösung
- 0,05 ml NADH/H⁺
- 0,01 ml GDH/TIM

Nun wurde im Photometer bei 366 nm die Extinktionsabnahme bis zu ihrem Stillstand (nach ca. 10 Minuten) verfolgt.

Die hier gemessene Extinktionsdifferenz E1 ist proportional der Menge an endogenem GAP und DAP. Nach Ablauf dieser Reaktion wurde

0,01 ml Aldolase zugegeben und erneut die Extinktionsabnahme E2 gemessen.

$$\mu\text{Mol FDP/ml Probenlösung} = \frac{\Delta E2 \times \text{Verd.} \times V_{\text{Küv.}}}{\epsilon \times d \times V_p \times 2};$$

Da pro Mol FDP 2 Mol NADH/H⁺ oxidiert werden, muß der ganze Ausdruck durch 2 dividiert werden; für weitere Zeichenerklärung s.13.4.

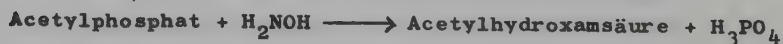
14.4. Eichkurve für FDP

Von einer 1 mM FDP-Lösung (0.55 mg/ml H₂O dest.) wurden steigende Mengen (5,5-44,0 µg) in den Test eingesetzt. Zur Aufstellung der Eichgeraden wurde in einem Diagramm ΔE2 gegen µg FDP aufgetragen.

15. Bestimmung von Acetat

Acetat wurde mit dem Farbstest nach Rose (1955) bestimmt.

15.1. Prinzip



Nach der Phosphorylierung von Acetat mit Acetatskinase (AK) und ATP zu Acetylphosphat, wurde dieses durch Hydroxylamin in Acetylhydroxamsäure überführt und so dem Gleichgewicht der Reaktion entzogen. Acetylhydroxamsäure bildet mit Eisen (III)-Salzen einen roten Farbkomplex, dessen Intensität der Acetatmenge im Bereich von 0,25 bis 2,0 μMol Acetat linear proportional ist. Die Farbintensität wurde bei 500 nm, dem Absorptionsoptimum, gemessen.

15.2. Reagenzien und Testansatz

Für die Durchführung des Testes wurden Reagenzien und Testansatz in der von Holz und Bergmeyer (1974) beschriebenen Standardmethode verwendet.

Folgende Lösungen wurden in ein Reagenzglas pipettiert:

-Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (0,1 M, pH 7,4) mit 4 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ pro Ltr.	0,50 ml
-ATP (24 mM)	0,20 ml
-Hydroxylamin (4 M)	0,20 ml
-Probe (Standard)	0,10 ml
-Acetatskinase (od. H_2O -Leerwert)	0,02 ml
mischen und 30 Minuten bei 35°C inkubieren, anschließend Zugabe von:	
-Trichloressigsäure (0,6 M)	1,00 ml
- FeCl_3 -Lösung (60 mM)	4,00 ml

Die Messung erfolgte gegen den Leerwert (anstatt AK wurde 0,02 ml H_2O dest. zugegeben). Bei jeder Meßreihe wurde auch der Standardwert (0,1 ml 10 mM Acetatlösung anstelle der Probelösung) bestimmt.

15.3. Berechnung der Acetat-Konzentration

Die Berechnung der Acetatkonzentration in der Probe erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\Delta E (\text{Probe}) \times \text{Verd. (Probe)}}{\Delta E (\text{Standard})} = \mu\text{Mol Acetat/ml};$$

16. Bestimmung von Äthanol

Äthanol wurde mit Alkohol-Dehydrogenase (ADH) nach der standardisierten Methode von Bernt und Gutmann (1974) bestimmt.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Oxydation von Äthanol zu Acetaldehyd:



Die Extinktionszunahme durch Entstehung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ wurde bei 366 nm gemessen.

16.1. Testansatz

Glycin-Hydrazin-Puffer (s.13.2.)	3,00 ml
NAD^+ (24 mM)	0,10 ml
Probe (bzw. H_2O als Leerwert)	0,20 ml
mischen und Extinktion gegen Leerwert ablesen	
ADH-Lösung	0,20 ml
mischen und Extinktion E_2 ablesen	

$$E_2 - E_1 = \Delta E$$

16.2. Berechnung der Äthanolkonzentration

Die Berechnung der Äthanolkonzentration erfolgte nach der Formel:

$$\mu\text{Mol/ml} = \frac{\Delta E \times V_{\text{Küv.}} \times \text{Verd.}}{\epsilon \times d \times V_p};$$

(Die Abkürzungen sind im Abschnitt 13.4. erläutert).

Zur Kontrolle wurde eine Eichkurve aufgestellt mit steigender Äthanolkonzentration von 0,5, 1, 2 und 3 ‰.

17. Bestimmung von Formiat

Formiat wurde mit der Formiat-Dehydrogenase (FDH) nach der Methode von Höpner und Knappe (1974) bestimmt. Das Prinzip

der Bestimmung beruht auf der Oxidation von Formiat zu Hydrogencarbonat unter gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ .



Die NADH/H^+ -Bildung wurde bei 366 nm gemessen; sie ist proportional der Formiatmenge. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Bestimmungsmethoden erfolgt hier die Ablesung der Extinktion nicht nach Erreichen eines Endwertes, sondern im maximalen Bereich der Extinktions-Zeit-Kurve.

17.1. Testansatz

Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0)	0,80 ml
NAD^+ (50 mM)	0,02 ml
Probe (bzw. H_2O als Leerwert)	0,16 ml
mischen und Extinktion E_0 ablesen;	
FDH-Lösung	0,02 ml
mischen und nach 4 Minuten ΔE_1 ablesen.	

Da die FDH auch NADH- und Formiat-Oxidase-Aktivität besitzt, wird auch mit dem Leerwert ein gewisser Umsatz erzielt ($\Delta E_{\text{Leerwert}}$), welcher vom Umsatz der Probe abzuziehen ist. Es wurde stets nur soviel lyophilisierte FDH aufgelöst, als für die Testbestimmung notwendig war, da die gelöste FDH nur einen Tag haltbar ist.

17.2. Bestimmung der Formiatkonzentration

Die Bestimmung der Formiatkonzentration erfolgte über eine Eichkurve. Von einer Na-Formiat-Standardlösung (5 mM) wurden 0,02, 0,05, 0,10 und 0,15 ml in den Test eingesetzt und mit Puffer auf 0,16 ml ergänzt.

18. Bestimmung der Laktatracemase-Aktivität

Eine Laktatracemase wurde zuerst von Dennis und Kaplan (1963) in Extrakten von Clostridium butylicum entdeckt. Später wurde

dann auch bei Lactobacillus sake (Hiyama et al. 1968), L. curvatus und L. casei ssp. pseudoplantarum (Stetter, 1973) eine Racemase nachgewiesen.

Dieses Enzym katalysiert die Hin- und Rückreaktion zwischen D- und L-Laktat ohne Bildung von Pyruvat als Zwischenprodukt und ohne Mitwirkung von NAD^+ (Dennis, 1963). Da die meisten Laktatracemasen sauerstoffempfindlich sind, wurde die Gewinnung und die Dialyse des zellfreien Extraktes in Gegenwart von Mercaptoäthanol (0,01 M) durchgeführt.

18.1. Testansatz

K-Na-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 6,5)	2,40 ml
zellfreier Extrakt (dialysiert)	1,00 ml
L-Laktat (16 mM)	0,60 ml
bei 25°C inkubieren	

Unmittelbar nach Zugabe von Laktat und zweimal im Abstand von je einer Stunde wurde jeweils 1 ml Probe entnommen und 2 Minuten lang abgekocht. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und der klare Überstand auf D- und L-Laktat getestet. Bei Vorhandensein einer Laktatracemaseaktivität wird aus dem eingesetzten L-Laktat D-Laktat gebildet, bis sich zwischen beiden Isomeren ein Gleichgewicht eingestellt hat.

Der Effekt der Laktatracemisierung wird auch durch das Zusammenwirken der NAD -abhängigen D- und L-LDH in Anwesenheit von NAD^+ erzielt.

19. Präparation des Zellextraktes für FDP-Pool-Bestimmung

19.1. Glucoseabbau in gepufferter Zellsuspension

Die Zellen von S. epidermidis ATCC 14990 wurden aerob in 1,5 l HD-Medium bei 37°C angezogen und am Ende der logarithmischen Phase abzentrifugiert. Nachdem die Zellen 2 x mit 0,1 M

Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen worden waren, wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Puffer auf eine OD_{578} von etwa 80-100 gebracht. Diese Zellsuspension wurde 30 Minuten bei 37°C geschüttelt, damit endogenes Substrat verbraucht wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension geteilt in je 10 ml und der eine Teil mit N_2 der andere mit O_2 begast. Gestartet wurde der Glucoseabbau durch Zugabe von 5 μ Mol Glucose/ml Zellsuspension.

Zu bestimmten Zeiten wurden 0,5 ml Probe entnommen und mit 0,5 ml 1 N $HClO_4$ versetzt (Sutherland und Wilkinson, 1971). Nach einer Einwirkungszeit von 1 Stunde wurden die ausgefällten Zellbestandteile abzentrifugiert. Der Überstand, der FDP und andere niedermolekulare Substanzen enthält, wurde zuerst mit 10 N und dann mit 0,1 N KOH neutralisiert (pH 5,0). Das ausgefällte $KClO_4$ wurde abzentrifugiert und aus dem Überstand die FDP-Konzentration bestimmt.

19.2. Membranfiltermethode

Aus den normal abzentrifugierten Zellen einer Zellkultur konnte kein intrazelluläres FDP nachgewiesen werden. Offensichtlich war die Zeitdauer, in der die Zellen einem exogenen Substratmangel ausgesetzt waren, zu lang und der FDP-Pool wurde dabei aufgezehrt. Durch die Membranfiltermethode konnte die "Hungerphase" erheblich verkürzt werden.

Die Bakterienzellen wurden in einem definierten Medium angezogen. Während der logarithmischen Phase wurden 20-30 ml der Bakterienkultur über einen Sartorius-Membranfilter (Porengröße 0,2 μ) abgesaugt. Bevor die Bakterien die Membran zu verstopfen drohten, wurden sie noch mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 nachgewaschen. Darauf wurde die Membran mit der Bakterien-schicht sofort mit 5 ml 0,5 N $HClO_4$ behandelt. Der ganze Vorgang - von der Probeentnahme bis zur Säurebehandlung - mußte in ca. 30-60 Sekunden durchgeführt werden. Nach einer Einwirkungszeit von etwa 30 Minuten wurde das ausgefällte Material abzentrifugiert und der Überstand wie oben (15.1) weiterverarbeitet.

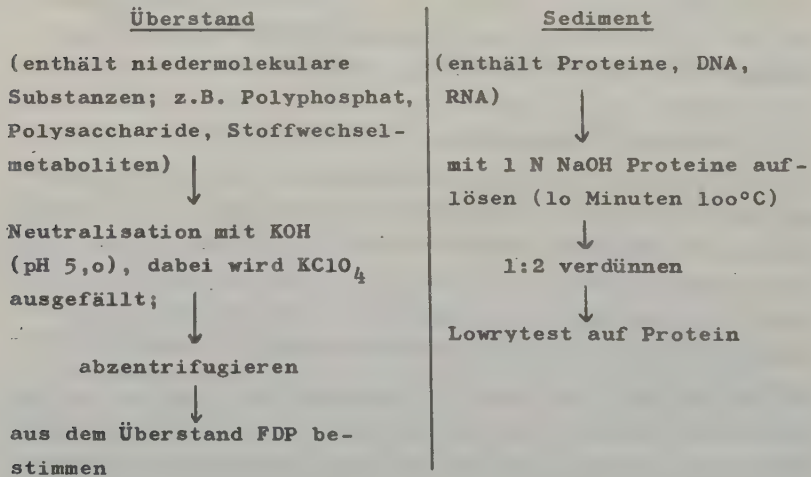
Das ausgefällte Protein im Sediment wurde durch heiße Alkalibehandlung (Zugabe von 2 ml 1 N NaOH und 10 Minuten lange Inkubation bei 100°C) in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 2 ml H₂O dest. konnte der Proteingehalt nach Lowry bestimmt werden. Der Proteingehalt diente als Bezugsgröße für den FDP-Pool.

19.3. Übersicht über das Aufschlußverfahren

Zellsuspension oder Zellsediment

+ 0,5 N HClO₄ (eisgekühlt)

gut mischen und nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten abzentrifugieren;



20. Bestimmung von freiem anorganischem Phosphat

(Chen et al., 1956)

Alle für den Test notwendigen Glasgeräte wurden mit H₂O dest. und EDTA vorbehandelt, um Phosphatreste zu entfernen.

Reagens:

10 ml 6 N H_2SO_4

20 ml H_2O dest.

10 ml 2,5 %ige Ammonium-Molybdat-Lösung

10 ml 10 %ige Ascorbinsäure

Dies Reagens muß frisch aus den Stammlösungen angesetzt werden. Diese sind bei 4°C mehrere Wochen haltbar.

Testansatz:

4 ml Probe

4 ml Reagens

Nach dem Durchmischen wurde das Reagenzglas mit Parafilm verschlossen und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 820 nm gemessen; als 0-Wert diente dest. H_2O anstelle der Probelösung.

Die Auswertung erfolgte mittels einer Eichkurve, in der 2-25 $\mu\text{g PO}_4^{3-}$ eingesetzt wurden; Ordinate: $E_{820 \text{ nm}}$ /Abszisse: (PO_4^{3-}).

Der Phosphatstandard enthielt 10 $\mu\text{g PO}_4^{3-}$ /ml H_2O dest. (1,44 g KH_2PO_4 /l; 1:100 verdünnt); das MG von $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ betrug 137,8.

20.1. Vorbereiten der Proben

Als Ausgangsmaterial dienten a) Zellsediment (Naßgewicht ca. 0.5 g) das in gleicher Weise wie für die FDP-Pool-Bestimmung aufgeschlossen wurde (s.15.c.) und b) zellfreier Extrakt (s.5.)

20.2. Fällung von anorganischem Phosphat als $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
(Delory, 1938)

Testansatz:

7,5 ml Zellextrakt

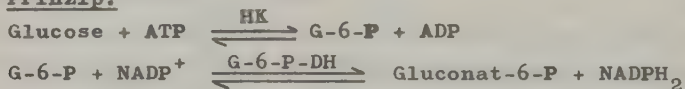
0,5 ml CaCl_2 , 2,5 %ig

0,5 ml MgCO_3 , 0,5 %ig

Dieses Gemisch wurde geschüttelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das gebildete Präzipitat abzentrifugiert und vorsichtig dekantiert. Das Präzipitat wurde 30 Minuten bei 80°C getrocknet und mit 2,5 ml 2 %iger NH_3 -Lösung gewaschen, abzentrifugiert und erneut getrocknet. Nun wurde das Präzipitat mit 0,5 ml 60 %iger HClO_4 aufgelöst, und nach Zugabe von 7,0 ml H_2O dest. konnte diese Probe dem oben beschriebenen Phosphatetest unterworfen werden.

21. Glucosebestimmung (Bergmeyer et al., 1974)

Prinzip:



Reagenzien:

0,3 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,5; mit 4 mM MgSO_4
10,0 mM NADP^+
15,0 mM ATP
HK und G-6-P-DH

Testansatz für Halbmikroküvette:

1,00 ml Puffer
0,20 ml Probe
0,05 ml ATP
0,05 ml NADP^+

Extinktion E1 bei 366 nm messen, dann Zugabe von
0,01 ml HK/G-6-P-DH

Wenn keine weitere Extinktionszunahme erfolgt, nach
ca. 10 Minuten dann E2 ablesen.

Die Extinktionszunahme durch Reduktion von NADP^+ ist proportional der Glucosekonzentration.

$$\mu\text{Mol Glucose/ml} = \frac{\Delta E \times \text{Verd.} \times V_{\text{Küv.}}}{\epsilon \times d \times V_p};$$

Zur Erläuterung der einzelnen Symbole s.13.4. Eine Eichkurve wurde regelmäßig mitgeführt.

22. Bestimmung des Trockengewichts (TG) (Mallette, 1969)

2 ml Bakteriensuspension wurden in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand (Medium) wurde verworfen, das Sediment 2 x mit H_2O dest. gewaschen, in ein Penizillingläschen überführt, über Nacht bei $100^{\circ}C$ getrocknet und anschließend gewogen. Das Gewicht des leeren, getrockneten Glases wurde vorher bereits festgestellt. Die Gewichts Differenz ist mg TG/2 ml und wurde umgerechnet auf TG/ml.

23. Standardtest zur Aktivitätsbestimmung der FDP-aktivierbaren L-LDH.

23.1. Reaktion von Pyruvat zu Laktat

Ansatz für Halbmikroküvette:

Einsatz	Bezeichnung	Konzentration d.Stammlösung	Endkonzentration i.Küvette
1,00 ml	Imidazolpuffer pH 6,3	0,100 M	82,00 mM
0,10 ml	Pyruvat (16 mg/ml)	0,145 M	12,30 mM
0,05 ml	NADH/ H^+ (10 mg/ml)	0,014 M	0,57 mM
0,05 ml	FDP (11 mg/ml)	0,020 M	0,80 mM

Nach Mischen des Küvetteninhalts wurden 0,02 ml Enzymlösung zugegeben, so verdünnt, daß die Extinktionsabnahme pro Minute nicht größer als 0,3 war. Gemessen wurde die Aktivität in einem Eppendorf-Photometer mit Kompensationsschreiber bei 366 nm.

23.2. Reaktion Laktat zu Pyruvat

Einsatz	Bezeichnung	Konzentration d. Stammlösung	Endkonzentration i. Küvette
1,00 ml	Trispuffer pH 7,5	0,100 M	77,00 mM
0,10 ml	Li-Laktat (D- oder L-)	1,000 M	77,00 mM
0,05 ml	NAD ⁺ (60 mg/ml)	0,090 M	3,46 mM
0,05 ml	FDP (11 mg/ml)	0,020 M	0,77 mM

Nachdem die Rückreaktion sehr viel langsamer abläuft als die physiologische Reaktion, wurden 0,10 ml Enzymlösung zugegeben und hohe Konzentrationen an Laktat und NAD⁺ verwendet.

Bei Aktivitätsmessungen von nicht FDP-aktivierbaren LDHs wurde FDP weggelassen. Die Standardtests wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

23.3. Enzymaktivität

$$U/ml = \frac{\Delta E/Min. \times V_{Küv.} \times Verd.}{\epsilon \times d \times v};$$

Verd. = Verdünnungsfaktor der Enzymlösung;

v = Volumen der eingesetzten Enzymlösung (ml);

Für weitere Symbole s. 13.4.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{U/ml}{\text{Protein (mg/ml)}};$$

C. E R G E B N I S S E

I. Übersicht über die Laktatproduktion der elektrophoretischen Beweglichkeit von D- und L-Laktat-Dehydrogenasen und deren biochemischen Merkmalen bei verschiedenen Staphylokokkenarten.

1. Bildung von D- und L-Laktat bei verschiedenen Staphylokokken

Staphylokokken sind, wenn sie anaerob angezogen werden, zur Energiegewinnung auf Kohlehydrate angewiesen. Bei der Vergärung von Glucose wird als Hauptendprodukt Laktat in das Nährmedium ausgeschieden. Die Konfiguration des gebildeten Laktats ist ein wertvolles Kriterium für die Klassifizierung von Staphylokokken. Wie in Tabelle 2 gezeigt wird, lassen sich die Staphylokokken aufgrund des überwiegend gebildeten Laktatisomers in 3 Hauptgruppen zusammenfassen.

Tab.2: Gruppierung von Staphylokokkenarten hinsichtlich des überwiegend gebildeten Laktatisomers bei der Glucosevergärung.

Dominierendes Laktatisomer	Arten
D und L	<u>S. aureus</u> <u>S. warneri</u>
D	<u>S. haemolyticus</u> <u>S. hominis</u>
L	<u>S. capitis</u> <u>S. cohnii</u> <u>S. epidermidis*</u> <u>S. intermedius*</u> <u>S. saprophyticus</u> <u>S. simulans</u> <u>S. xylosus</u>

* Bei beiden Arten ist die L-LDH FDP-aktivierbar.

Die meisten der hier erwähnten Arten wurden von Schleifer und Kloos beschrieben (Schleifer und Kloos, 1975 und Kloos und Schleifer, 1975). In dieser Tabelle wurde auch S. intermedius berücksichtigt, eine von Hajek (1976) beschriebene Art. Die Vertreter dieser Art wurden von Tieren isoliert und nehmen hinsichtlich ihrer Merkmale eine gewisse Mittelstellung zwischen S. aureus und S. epidermidis ein.

In Tabelle 3 sind die Typenstämmen der in Tabelle 2 erwähnten Arten mit Menge und prozentualen Anteil des ausgeschiedenen Laktatisomers aufgeführt.

Tabelle 3: Menge und prozentuale Verteilung von D- und L-Laktat nach Fermentation von Glucose bei den verschiedenen Typenstämmen.

Species	Bezeichnung	μMol/ml		% -Laktat	
		D- Laktat	L- Laktat	D	L
<u>Staphylococcus:</u>					
S.aureus	ATCC 12600	9,7	7,4	56	44
S.warneri	ATCC 27836	12,7	13,4	48	52
S.haemolyticus	DSM 20263	14,3	0	100	-
S.hominis	ATCC 27844	13,5	0	100	-
S.capitis	ATCC 27840	0,5	13,5	4	96
S.cohnii	DSM 20260	0	3,1	-	100
S.epidermidis	ATCC 14990	0	16,2	-	100
S.intermedius	CCM 5739	0	14,8	-	100
S.saprophyticus	CCM 883	0,6	10,5	5	95
S.simulans	ATCC 27848	0	19,3	-	100
S.xylosum	DSM 20267	0	5,2	-	100
<u>Micrococcus:</u>					
M.kristinae	ATCC 27570	0	22,9	-	100
M.varians	CCM 884	0	12,5	-	100

Die hier aufgeführten Stämme wurden anaerob (ohne Schütteln) in Hefe-Dextrose-Bouillon angezogen. Normalerweise hatte nach 12 Stunden die Bakterienkultur das Ende der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet und die LDHs isoliert. Gleichzeitig wurde auch die Konzentration des in das Medium ausgeschiedenen D- und L-Laktats untersucht.

Die genannten Stämme von S. capitis, S. cohnii, S. saprophyticus und S. xylosus vergären Glucose schlechter als die restlichen Stämme und wurden deshalb 24 Stunden bebrütet. Zusätzlich wurden in dieser Tabelle auch die Typenstämme zweier Mikrokokkenarten aufgenommen, da sie, ähnlich wie Staphylokokken, unter anaeroben Bedingungen wachsen und Glucose vergären können.

2. Elektrophoretische Beweglichkeit der NAD-abhängigen LDHs

Die LDHs der Typenstämme der in Tabelle 2 erwähnten Arten wurden hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit untersucht. Dabei zeigte sich, daß die FDP-aktivierbaren LDHs in Gelsystemen mit Tris/HCl als Gelpuffer nach der Elektrophorese trotz Zugabe von FDP keine Aktivität mehr aufwiesen. Das gleiche Phänomen trat auch bei den von Stetter (1973) beschriebenen FDP-aktivierbaren LDHs aus *Lactobacillus*-arten auf. Trispuffer hatte einen negativen Effekt auf die Aktivität bzw. Stabilität dieser FDP-aktivierbaren LDHs. Jedoch bei Verwendung des Glycyl-Glycin-NaOH-Puffers (nach Stetter, 1973) im Gelsystem waren die aktivierbaren LDHs auch nach dem Elektrophoreseablauf in Gegenwart von FDP aktiv.

Leider konnte dieses Gelsystem mit Glycyl-Glycin-NaOH-Puffer nicht ohne weiteres auf die Plattengelelektrophorese über-

tragen werden. Spannung und Stromstärke konnten nämlich trotz Variation der Molarität des Elektrolytpuffers nicht in den sonst üblichen Bereich (200-400 V, 10-20 mM) gebracht werden. Aus diesem Grund wurde für Elektrophoresen mit anschließender Aktivitätsfärbung die Diskelektrophorese mit Röhrchen verwendet. Der Nachteil dieser Methode, daß die Gele dabei nie vollständig aufeinander abzustimmen waren, wurde durch Koelektrophorese ausgeglichen.

Die Laktatkonfiguration wird bei den Staphylokokken überwiegend durch das Vorhandensein der stereospezifisch wirkenden, NAD-abhängigen D- oder L-LDH bestimmt. Zur Unterscheidung von D- oder L-LDH wurde im Anschluß an die Elektrophorese bei der Aktivitätsfärbung das D- oder L-Laktatisomer als Substrat angeboten. Ein Gel wurde stets ohne Substrat behandelt, um das Vorhandensein von Diaphorasen zu überprüfen.

Abbildung 1 zeigt die elektrophoretische Beweglichkeit der D- und L-LDH von S. aureus CCM 2570 (früher als S. aureus 3528 bezeichnet). Die Aktivitätsfärbung wurde im Anschluß an die Elektrophorese mit den Laktatisomeren bzw. mit Pyruvat durchgeführt. Die D-LDH von S. aureus CCM 2570 wandert etwas weiter als die L-LDH. Bei der Aktivitätsfärbung mit D- und L-Laktat oder mit Pyruvat erscheinen beide Banden. Eine Koelektrophorese der beiden L-LDHs aus S. aureus CCM 2570 und S. epidermidis ATCC 14990 zeigt deutlich, daß die S. epidermidis-L-LDH eine größere Wanderungsgeschwindigkeit besitzt.

Bemerkenswert ist, daß das Elektrophoresemuster der beiden LDHs aus S. aureus CCM 2570 völlig identisch ist mit dem Elektrophoresemuster von S. aureus ATCC 12600 (s. Abb. 1 und 2).

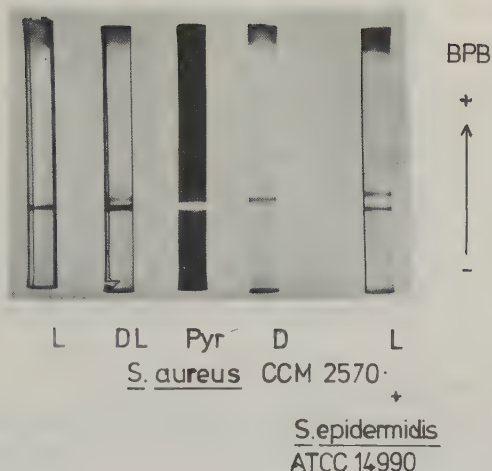


Abb. 1:

Elektrophoretische Beweglichkeit von D- und L-LDH aus S. aureus CCM 2570 und Koelektrophorese der L-LDHs von S. aureus CCM 2570 und S. epidermidis ATCC 14990.

Von links nach rechts: Gel 1 wurde mit L-Laktat, Gel 2 mit D- und L-Laktat, Gel 3 mit Pyruvat und Gel 4 mit D-Laktat als Substrat entwickelt. Die Entwicklung der Koelektrophorese im letzten Gel erfolgte mit L-Laktat als Substrat und FDP als Aktivator für die L-LDH aus S. epidermidis. Pro Gel wurden ca. 100-160 µg Protein (zellfreier Extrakt) aufgetragen. BPB = Bromphenolblau.

Abbildung 2 zeigt die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von D- und L-LDH aus S. aureus ATCC 12600 und der D-LDH aus S. warneri ATCC 27836. Beide Typenstämme sind Vertreter jener beiden Arten, die D- und L-Laktat in annähernd gleicher Menge bilden.

Während die D-LDH von S. warneri sowohl im optischen Test (Laktat zu Pyruvat) als auch elektrophoretisch gut nachweisbar war, konnte die L-LDH mit den genannten Methoden nicht nachgewiesen werden.

Eine Laktat-Racemase, die für die Bildung von L-Laktat verantwortlich hätte sein können, ließ sich nicht nachweisen.

Erst die Überlegung, daß neben der D-LDH noch eine FDP-aktivierbare L-LDH vorhanden sein könnte, führte auf die richtige Spur. Im optischen Test konnte durch Zugabe von FDP bei der Reaktion von Pyruvat zu Laktat (MM 23,1) die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich gesteigert werden. FDP und NADH/H^+ allein, ohne Pyruvat im Testansatz, ergaben keine Reaktion. Durch Zugabe von FDP in die Entwicklerlösung konnte nun auch mit L-Laktat die L-LDH sichtbar gemacht werden (s.Abb.3). Allerdings traten bei Entwicklung mit L-Laktat als Substrat 2 Banden auf (s.Abb.3, Gel 3). Die obere Bande entspricht in ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der FDP-aktivierbaren L-LDH aus S.epidermidis ATCC 14990 (s.Abb.3, Gel 5). Ob das Auftreten zweier Banden bei Entwicklung mit L-Laktat auf das Vorkommen zweier verschiedener L-LDHs zurückzuführen ist, oder ob die L-LDH von S.warneri in 2 Komponenten unterschiedlichen Molekulargewichtes aufgespalten wird (z.B. Tetramer-Dimer-Form), muß noch genauer untersucht werden.

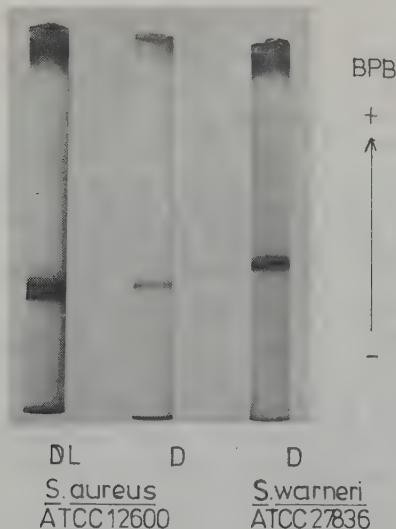


Abb.2:

Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit der D-LDHs von S. aureus ATCC 12600 und S. warneri ATCC 27836. Entwicklung der Gele von links nach rechts:

Gel 1 wurde mit D- und L-Laktat, Gel 2 und 3 nur mit D-Laktat als Substrat entwickelt.

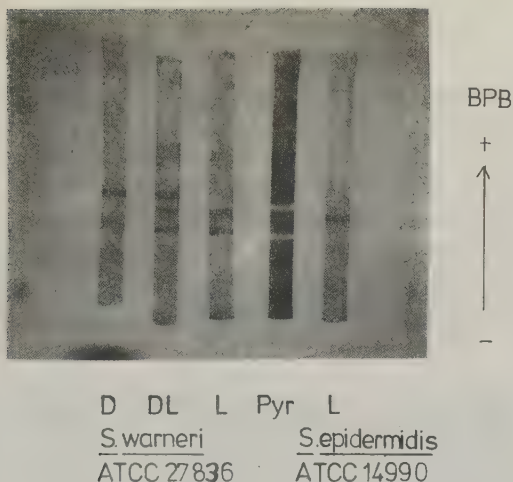


Abb. 3:

Elektrophoretische Beweglichkeit von D- und L-LDH aus S. warneri ATCC 27836 (Gel 1-4) und im Vergleich dazu die L-LDH aus S. epidermidis ATCC 14990 (Gel 5).

Gel 1 wurde mit D-Laktat, Gel 2 wurde mit DL-Laktat, Gel 3 wurde mit L-Laktat, Gel 4 wurde mit Pyruvat und Gel 5 wurde mit L-Laktat entwickelt.

Bemerkenswert ist, daß die obere Bande der L-LDH von S. warneri ATCC 27836 die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit aufweist wie die ebenfalls FDP-aktivierbare L-LDH von S. epidermidis ATCC 14990. Abbildung 2 zeigt einen Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit der D-LDHs von S. aureus und S. warneri; Abbildung 3 zeigt die elektrophoretische Beweglichkeit der D- und L-LDH von S. warneri.

Aus Abbildung 2 ist zu ersehen, daß die D-LDH von S. warneri deutlich weiter wandert als die D-LDH von S. aureus.

In Abbildung 4 wurden die D-LDHs von S. hominis ATCC 27844 und S. haemolyticus DSM 20263 mit der D-LDH von S. aureus ATCC 12600 verglichen. Die D-LDHs von S. hominis und S. haemolyticus - beide Stämme bilden 100 % D-Laktat (s.Tab.3) - unterscheiden sich deutlich durch ihre größere Wanderungsgeschwindigkeit von der D-LDH aus S. aureus.

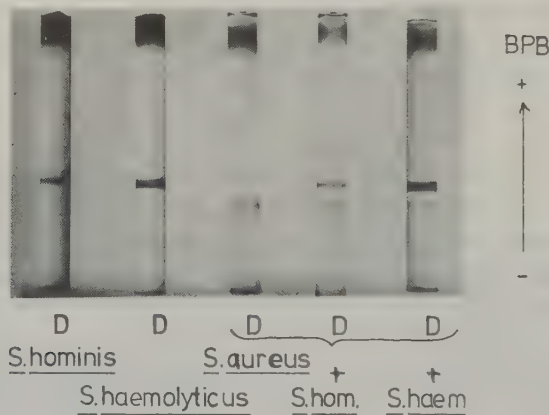


Abb. 4:

Alle Polyacrylamid-Gele wurden mit D-Laktat als Substrat entwickelt. Auf die Gele wurde zellfreier Extrakt aufgetragen.

Von links nach rechts: Gel 1, S. hominis ATCC 27844; Gel 2, S. haemolyticus DSM 20263 und Gel 3, S. aureus ATCC 12600. Gel 4 und 5 zeigen Koelektrophoresen der S. hominis-D-LDH und S. haemolyticus-D-LDH mit der D-LDH von S. aureus (untere Bande).

Abbildung 5 zeigt die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit FDP-aktivierbarer L-LDHs verschiedener Vertreter der Art S. intermedius. Der Typenstamm S. intermedius CCM 5739 und 17 weitere Stämme dieser Art

(s.Tab.1 und Abb.26) weisen die gleiche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit auf. Diese Art ist in ihrer Gesamtheit durch die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit gut von den anderen Arten abzugrenzen. Eine Koelektrophorese mit der ebenfalls FDP-aktivierbaren L-LDH von S. epidermidis ATCC 14990 (Abb.6) zeigt, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der L-LDHs von S. intermedius deutlich größer ist, als die der S. epidermidis-L-LDH.

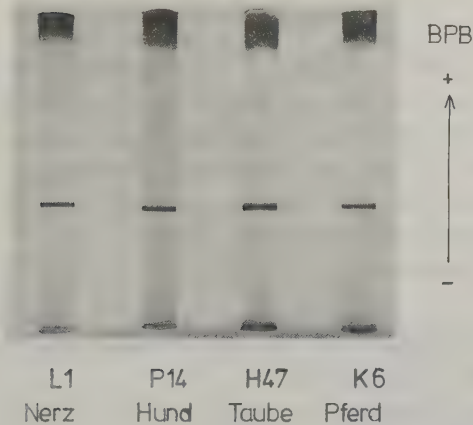


Abb.5:

Diskelektrophorese der FDP-aktivierbaren L-LDH von vier S.intermedius-Stämmen, isoliert aus vier verschiedenen Biotopen (s.Tab.1).

Die Gele wurden mit L-Laktat als Substrat und FDP als Aktivator entwickelt.

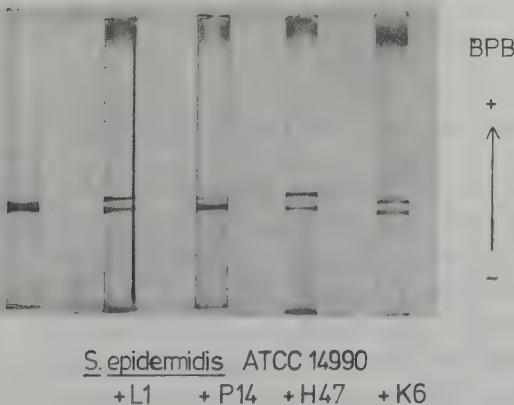


Abb. 6:

Koelektrophorese der in Abbildung 5 gezeigten Stämme mit der L-LDH von S.epidermidis ATCC14990.

3. Physiologische und enzymatische Untersuchungen zur Bildung von D- und L-Laktat bei *S. aureus* ATCC 12600

Aufgrund der in der Literatur herrschenden widersprüchlichen Meinungen bezüglich der Entstehung des D- und L-Laktats bei *S. aureus* (Stockland und San Clemente, 1968 und 1969), wurden *S. aureus* ATCC 12600 und CCM 2570 näher untersucht. Beide Stämme weisen, was die Laktatbildung betrifft, so einheitliche Merkmale auf, daß es genügt, nur auf einen Vertreter, den Typenstamm ATCC 12600, näher einzugehen.

3.1. Bildung von D- und L-Laktat während des Wachstumsverlaufs

Beide Laktat-Isomere werden bereits zu Beginn des Wachstums gebildet, wobei die Konzentration des D-Laktats etwas höher liegt als die des L-Laktats (s. Abb. 7). Nach einer Wachstumszeit von 25 Stunden, bereits in der stationären Phase, nimmt der Gehalt an L-Laktat sogar etwas ab, während der für D-Laktat noch leicht ansteigt.

3.2. Isolierung und Charakterisierung der NAD-abhängigen D- und L-LDH von *S. aureus* ATCC 12600

Stockland und San Clemente (1968 und 1969) glaubten aufgrund gelelektrophoretischer Befunde, daß die Bildung der beiden Laktatisomeren durch das Zusammenwirken einer NAD-abhängigen L-LDH und einer Racemase zustande kommt.

Die Untersuchungen haben ergeben, daß eine Racemase bei *S. aureus* nicht nachweisbar ist. Ferner spricht gegen das Vorhandensein einer Racemase auch - sofern diese wie bei einigen Lactobacillen durch L-Laktat induzierbar wäre (Stetter, 1973) -, daß bei *S. aureus* bereits zu Beginn des Wachstums D- und L-Laktat in gleicher Menge gebildet wird. Bei den racemasebildenden Lactobacillen wird zunächst L-Laktat produziert und erst, wenn dieses eine ausreichende Konzentration erreicht hat, um die Racemasesynthese induzieren zu können, wird auch D-Laktat durch die Racemaseaktivität gebildet.

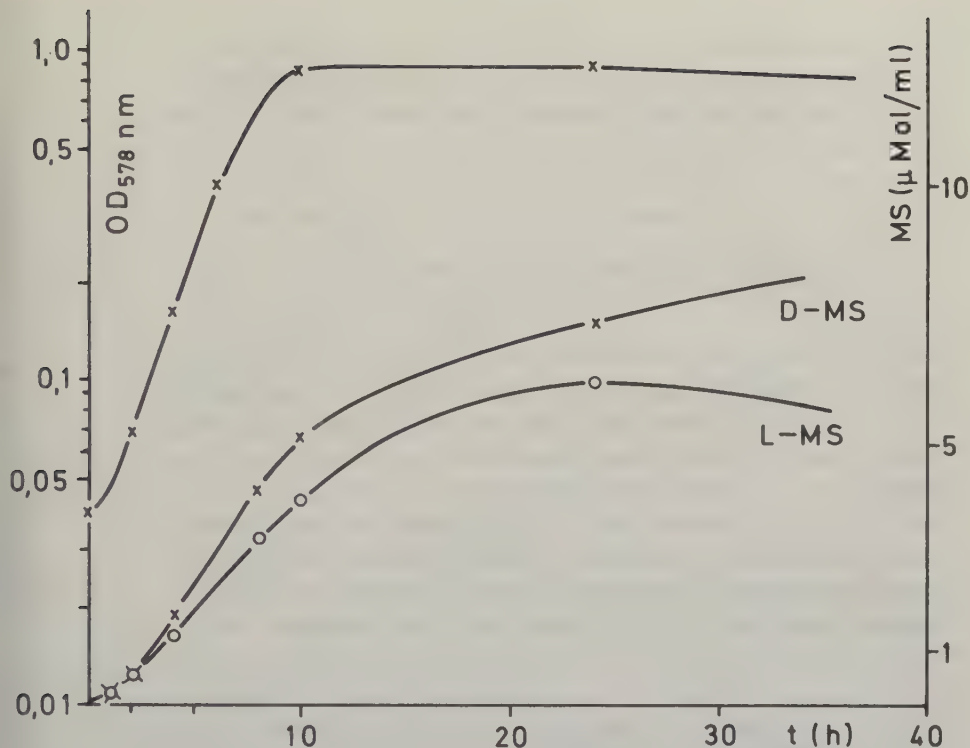


Abb. 7:

Wachstumsverlauf von *S.aureus* ATCC 12600 in HD-Medium und die damit einhergehende Produktion von D- und L-Milchsäure (MS). Der pH-Wert erniedrigte sich dabei nach 24 Stunden von 7,1 auf 5,0.

Die Isolierung und Trennung der D- und L-LDH erfolgte durch Affinitätschromatographie mit dem Oxamatderivat der Sepharose. Oxamat übt auf die Aktivität der D-LDH, im Gegensatz zur L-LDH, keinen hemmenden Einfluß aus. Bei der Affinitätschromatographie wurde dann auch festgestellt, daß die D-LDH im Gegensatz zur L-LDH nicht an das Sepharose-Oxamat-Derivat gebunden wird.

Die D-LDH wurde mit den restlichen nicht adsorbierten Proteinen eluiert, während die L-LDH an das Gel gebunden blieb. Bei Weglassen von NADH/H^+ und Zugabe von $0,4 \text{ M } \text{NH}_4\text{Cl}$ zu dem Eluierpuffer wurde auch die L-LDH desorbiert.

Mit dieser Methode konnte zweierlei erreicht werden:

- a) die Trennung von D- und L-LDH und
- b) eine über 90-fache Anreicherung der L-LDH.

Zur Ermittlung der Hemmkonstanten K_i (Oxamat) der L-LDH wurde die Dixon-Auftragung gewählt (Abb.7). In diesem Diagramm wurde der Reziprokwert der Reaktionsgeschwindigkeit gegen eine steigende Oxamatkonzentration aufgetragen. Dieser Versuch mit der Hemmkinetik wurde bei 2, 1 und 0,5 mM Pyruvat im Testansatz durchgeführt. Aus der Position des Schnittpunktes der Geraden kann man einmal ersehen, daß es sich um einen kompetitiven Hemm-Mechanismus handelt, und zum anderen kann man durch die Lage des Schnittpunktes den K_i -Wert bestimmen.

In Tabelle 4 sind einige charakteristische Merkmale der D- und L-LDH aus S. aureus ATCC 12600 aufgeführt. Während die kinetischen Daten - wie K_m -Werte für die jeweiligen Substrate und Kosubstrate - keine grundlegenden Unterschiede aufweisen, unterscheiden sich beide Formen dafür deutlich im Molekulargewicht, dem pH-Optimum und der Hemmbarkeit durch Oxamat.

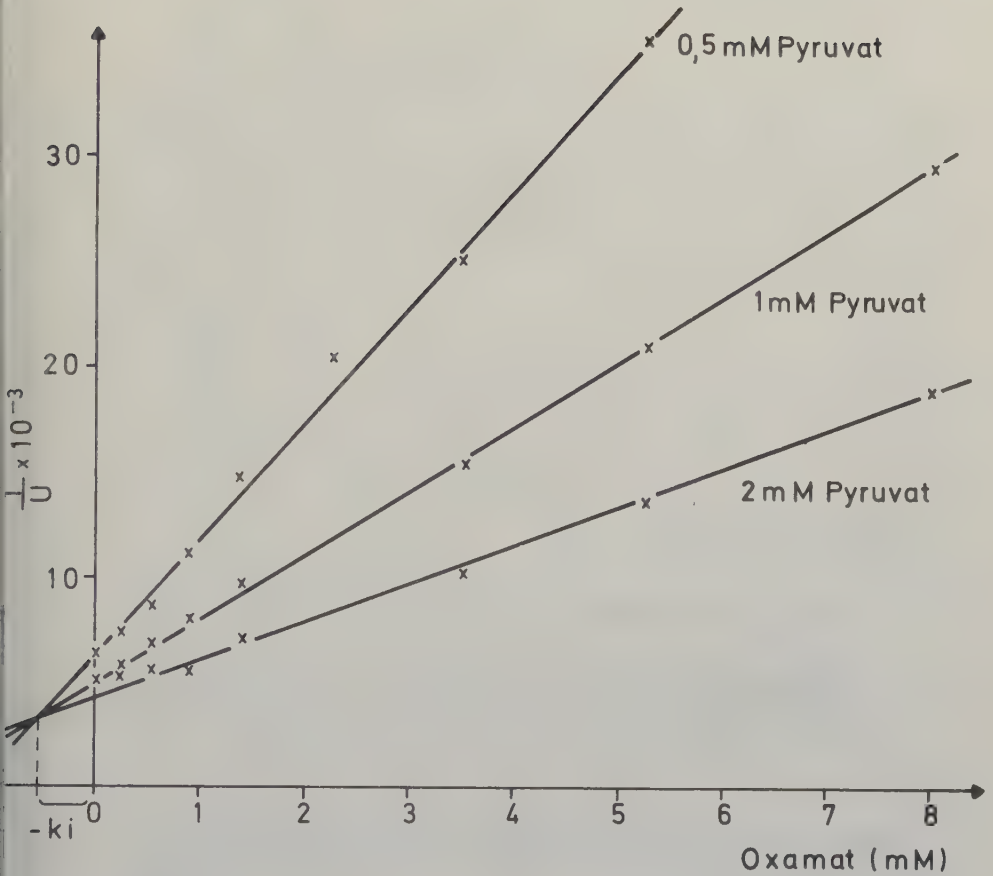


Abb.8:

Bestimmung des Hemmtyps von Oxamat und der Inhibitor-
konstante K_i (nach der Methode von Dixon, 1964) bei der
L-LDH von S. aureus ATCC 12600, K_i (Oxamat) = 5×10^{-4} M.

Tab.4: Vergleich einiger Merkmale der D- und L-LDH aus S.aureus ATCC 12600.

	<u>S.aureus</u> ATCC 12600	
	D-LDH	L-LDH
Molekulargewicht	68 000	125 000
pH-Optimum	5,0	7,5
K_m (mM) für:		
Pyruvat	0,35	0,90
NADH/H ⁺	0,80	0,70
D-Laktat	17,00	-
L-Laktat	-	45,00
NAD ⁺	0,80	0,80
Hemmung der Aktivität durch Oxamat:	-	+

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation. In Abbildung 9 ist die Aktivitätsverteilung der D- und L-LDH und der ADH als Standardprotein zu sehen. Im Gegensatz zur FDP-aktivierbaren L-LDH von S. epidermidis ATCC 14990 (s.Abb.14 und 15) waren hier keine Stabilisatoren zur Aufrechterhaltung der Struktur notwendig.

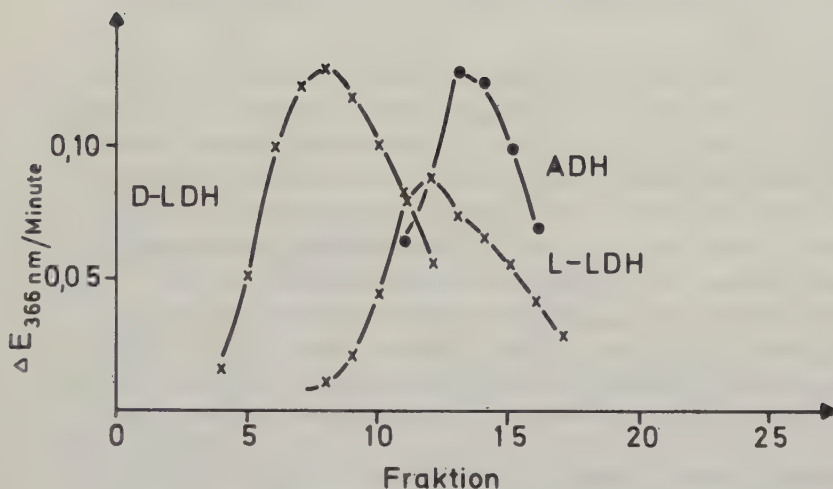


Abb. 9:

Aktivitätsverteilung der D- und L-LDH von S. aureus ATCC 12600 und der ADH aus Hefe als Standardenzym.

Die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde ohne zusätzliche Komponenten bei pH 6,2 durchgeführt. Für die D-LDH errechnete sich hier ein Molekulargewicht von rund 68 000 und für die L-LDH von rund 125 000.

II. Reinigung und Untersuchung biochemisch-physikalischer Eigenschaften der FDP-aktivierbaren L-LDH von S. epidermidis ATCC 14990.

4. Untersuchung der Stabilität der FDP-aktivierbaren L-LDH

4.1. Einfluß von Puffer, pH, FDP und hochkonzentrierten Lösungen auf die Erhaltung der Stabilität

Die Reinigung dieser LDH bereitete anfänglich große Schwierigkeiten, da das Enzym äußerst instabil war. In einem 1:10 verdünnten zellfreien Extrakt war nach 15-stündiger Lagerung

bei 4°C ein über 50 %iger Verlust der LDH-Aktivität zu verzeichnen.

Auf der Suche nach Stabilisierungsfaktoren (s.Tab.5) wurden verschiedene Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten getestet, aber wie aus Tabelle 5 hervorgeht, hatte keiner der erwähnten Puffer einen Effekt auf die Erhaltung der Stabilität des Enzyms. Lediglich die Zugabe von FDP (1 mM), einer 30 %igen Glycerinlösung oder 40 %igen Ammoniumsulfatlösung bewirkte eine Erhaltung der LDH-Aktivität über mehrere Tage. Bei der Ammoniumsulfatlösung blieb die Stabilität sogar über Wochen erhalten. Auch NADH/H⁺ scheint einen gewissen stabilisierenden Einfluß zu besitzen, da die Restaktivität nach 15 Stunden immerhin noch 84 % betrug.

Wie sich später herausgestellt hat, wird auch bei hoher Phosphatkonzentration (1,0 - 2,0 M Phosphatpuffer, nach Sörensen) das Enzym stabilisiert. Bei dieser hohen Konzentration hat Phosphat auch einen aktivierenden Effekt, der dem von 1 mM FDP entspricht (s.Abb.25). Ammoniumsulfat hingegen besitzt nur eine stabilisierende Wirkung und hat auf die Aktivierung der L-LDH keinen Einfluß.

Aus Tabelle 5 geht auch hervor, daß die L-LDH in den verschiedenen Puffersystemen unterschiedliche Aktivitäten aufweist, und daß mit steigendem pH-Wert auch die Aktivität des Enzyms abnimmt. Die stabilisierende Wirkung von FDP beweist, daß der Aktivitätsschwund der LDH nicht auf Proteinaseeinwirkung zurückzuführen ist.

Kationen wie Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, NH₄⁺ und K⁺ haben auf die Stabilisierung oder Aktivierung der LDH keinen Einfluß. Wie aus Tabelle 5 weiterhin hervorgeht, ist der Verlust der Stabilität der LDH zum Teil wenigstens ein Konzentrations-effekt. Abgesehen von FDP haben nur hohe Konzentrationen an Glycerin, Ammoniumsulfat oder Phosphat eine stabilisierende Wirkung.

Tab.5: Einfluß von konzentrierten Lösungen, von verschiedenen Puffern, des pH-Wertes und von anderen möglichen Effektoren auf die Stabilität der LDH.

Puffer bzw. Lösungen*	pH	spez. Aktivität		% Rest-aktivität
		t_0	t_{15}^{**}	
H ₂ O dest	5,8	1,4	0,43	30
Phosphatpuffer (0,1 M)	6,5	2,6	0,76	29
	7,0	2,1	0,94	44
	7,55	1,5	0,50	33
Tris/HCl (0,1 M)	7,2	1,1	0,40	40
	8,0	0,4	0,10	25
Imidazol/HCl (0,1 M)	6,5	2,4	0,80	33
	7,2	1,2	0,36	30
Glycylglycin/NaOH (0,1 M)	7,6	1,7	0,43	25
	8,0	0,7	0,21	30
Triäthanolamin/HCl (0,1 M)	7,6	0,9	0,30	33
	(0,4 M)	7,6	0,5	60
Phosphatpuffer, 0,1 M mit:	7,0			
a) FDP (1 mM)		9,5	9,70	102
b) NADH/H ⁺ (0,3 mM)		2,1	1,77	84
c) MgCl ₂ (0,5 mM)		1,8	0,90	50
d) MnSO ₄ (0,5 mM)		0,9	0,36	40
e) DTE (0,5 mM)		1,5	0,75	50
30 % Glycerinlösung	6,5	8,5	8,3	98
40 % Ammoniumsulfat	6,5	10,4	10,4	100
Phosphatpuffer (1,5 M)	7,0	4,5	4,4	98

* Der dialysierte zellfreie Extrakt wurde 1:10 mit den angegebenen Lösungen verdünnt.

**Die LDH-Aktivität wurde unmittelbar nach dem Verdünnungsschritt (t_0) und nach 15 Stunden (t_{15}) getestet (MM 23.1).

4.2. Verdünnungseffekt

Der Stabilitätsverlust der LDH kann durch den Verdünnungseffekt demonstriert werden (Abb. 10).

In Gegenwart von Stabilisatoren wie FDP oder 40 %iger Ammoniumsulfatlösung nimmt die LDH-Aktivität entsprechend der Proteinkonzentration ab (s. Abb. 10 B). Die spezifische Aktivität bleibt hier trotz abnehmender Proteinkonzentration gleich.

In Abwesenheit eines Stabilisators nimmt die LDH-Aktivität stärker ab, als es dem jeweiligen Verdünnungsschritt entspricht (s. Abb. 10 A).

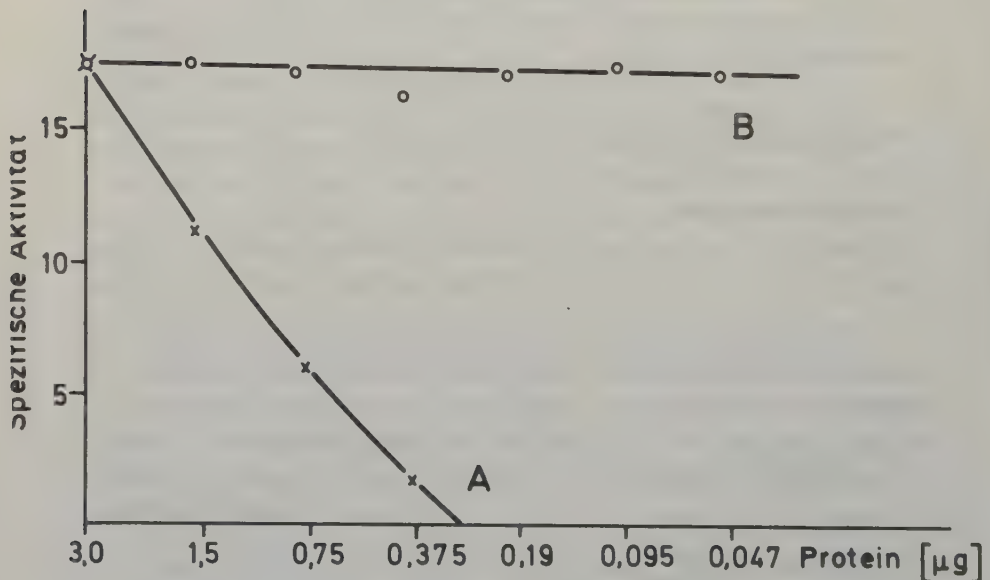


Abb. 10:

Einfluß der Verdünnung auf die LDH-Aktivität. Dialysierter zellfreier Extrakt wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0), der bei A keinen Stabilisator und bei B 0,5 mM FDP + 0,1 mM NADH/H⁺ als Stabilisator enthielt. Die LDH-Aktivität wurde im normalen Standardtest (s. MM 23.1.) ermittelt.

Dieser Verdünnungseffekt demonstriert einmal die Labilität der LDH und macht zum anderen deutlich, daß Reinigungsschritte durch säulenchromatographische Trennmethoden erschwert werden.

So war es z.B. nicht verwunderlich, daß nach einem Sephadex G 200-Lauf keine LDH-Aktivität gefunden werden konnte. Erst die Gegenwart von FDP und NADH/H^+ im Eluerpuffer und in der Probenlösung bewirkten eine gewisse Erhaltung der Enzymaktivität. Wie später noch gezeigt werden wird, (9.3.1 und 2) ist dieser Verdünnungseffekt auf den Zerfall der L-LDH in Untereinheiten zurückzuführen.

5. Reinigung der FDP-aktivierbaren LDH durch Affinitätschromatographie.

Die Reinigung der LDH mit dem Sepharose-Oxamat-Derivat wurde im Prinzip nach der Methode von O'Carra und Barry (1972) durchgeführt.

Für die FDP-aktivierbare LDH mußten allerdings andere Bedingungen gefunden werden, als es die oben genannten Autoren für die Schweineherz LDH-iso-1 angaben. Die Schweineherz LDH-iso-1 konnte in Gegenwart von 0,1 mM NADH/H^+ und 0,5 M NaCl von dem Oxamatderivat gebunden werden und wurde entbunden, wenn NADH/H^+ entfernt war. Ein Versuch mit kommerzieller Schweineherz LDH-iso-1 bewies die Funktionstüchtigkeit des Säulenmaterials.

Die FDP-aktivierbare LDH konnte unter den oben erwähnten Bedingungen nicht an das Oxamatderivat gebunden werden. Trotz der Gegenwart von NADH/H^+ (in variierenden Konzentrationen von 0,1 - 2,0 mM) und FDP (2,0 - 5,0 mM) wurde bei 0,5 M NaCl-Konzentration die L-LDH mit den übrigen Proteinen eluiert. Die NaCl-Konzentration mußte bei Verwendung von 50 mM Phosphatpuffer pH 6,2 auf 0,1 M NaCl reduziert werden, damit die LDH gebunden blieb. Bei Verwendung von NH_4Cl konnte die Konzentration auf 0,18 M erhöht werden.

Die Zugabe von 30 % Glycerin als Stabilisator führte zu keinem Erfolg. Lediglich die Verwendung von 0,5 M Phosphatpuffer, ohne zusätzliches Salz, bewirkte in Gegenwart von NADH/H^+ (0,1 mM) und FDP (2 mM) eine Bindung der LDH an das Oxamatderivat. Beim Weglassen von NADH/H^+ wurde die LDH eluiert.

Zur Reinigung der LDH wurden 6 ml zellfreier Extrakt (der bereits NADH/H^+ und FDP enthielt) mit einem Proteingehalt von 12 mg/ml auf die Säule aufgetragen. Der zellfreie Extrakt war ultrazentrifugiert, um Zellpartikel wie Ribosomen, die die Matrix verstopfen, zu entfernen. Das Säulenmaterial wurde nach Auftragen des zellfreien Extraktes mit 100 ml 50 mM Phosphatpuffer, der 0,18 M NH_4Cl , FDP, NADH/H^+ und DTE enthielt, gewaschen. Das Eluat wies einen hohen Proteingehalt auf, zeigte jedoch keine LDH-Aktivität. Erst nach Weglassen von NADH/H^+ wurde auch die LDH eluiert. Um die schleppende Desorption zu beschleunigen, wurden 0,3 M NH_4Cl verwendet. Nach der Regeneration des Säulenmaterials mit 0,6 M und später auch mit 1,0 M NaCl wurde der Versuch mit dem gewonnenen Eluat wiederholt.

Die Bindung der LDH an das Oxamatderivat mußte relativ locker sein, da eine Erhöhung der NH_4Cl -Konzentration auf 0,2 M bereits zu einer schwachen, aber doch kontinuierlichen Desorption der LDH führte. Eine Zusammenfassung der Reinigungsschritte ist in Tab. 6 wiedergegeben.

Tab.6: Übersicht über die Anreicherung der L-LDH von S. epidermidis ATCC 14990 durch Affinitätschromatographie.

Reinigungs- schritte	Volu- men (ml)	Gesamt- protein (mg)	Ges.En- zymakti- vität (Units/ ml)	LDH- Aus- beute (%)	spez. Akti- vität	Anrei- cherung
zellfreier Extrakt	6	72.00	1200	100	17	1
1.Affinitäts- chromatographie	6	0,90	1020	85	1133	67
2.Affinitäts- chromatographie	5	0,25	655	55	2220	130

5.1. Plattengelelektrophorese

Zur Kontrolle der einzelnen Reinigungsschritte wurde eine Plattengelelektrophorese durchgeführt (Abb.11). In die Taschen des Gels wurden jeweils 10 µl Probe von den in Tab. 6 angegebenen Enzymlösungen aufgetragen. Nach dem Elektrophoreselauf wurde eine Proteinfärbung durchgeführt, aus der der Reinigungsgrad ersichtlich war.

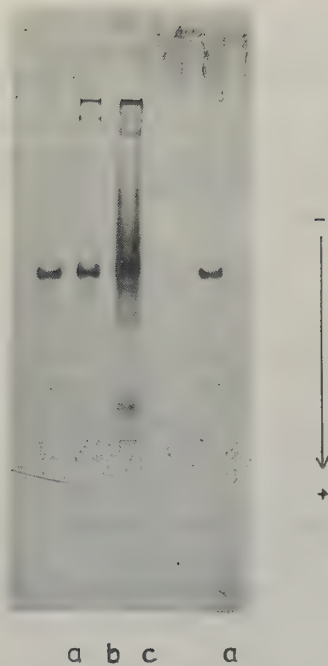


Abb. 11:

Plattengelelektrophorese
mit Proteinfärbung.

Die verschiedenen Proben
sind:

- a) 2. Affinitätschromato-
graphie
- b) 1. Affinitätschromato-
graphie
- c) zellfreier Extrakt.

Der Pfeil gibt die Lauf-
richtung an.

6. Aktivierung der LDH durch FDP

6.1. Restaktivität im zellfreien Extrakt

Im zellfreien Extrakt von S. epidermidis war auch ohne FDP bereits LDH-Aktivität vorhanden. Die Aktivität konnte jedoch in der Regel durch Zugabe von FDP um das 2-5 fache gesteigert werden. Es schien also im ersten Moment, als ob FDP für die LDH-Aktivität nicht essentiell sei.

Erhöhte man die Temperatur des eisgekühlten zellfreien Extraktes etwa 1/2 Stunde lang auf 25°C, so war die Restaktivität (ohne FDP) um das 2-3 fache geringer als bei dem gekühlten Extrakt. Die Zugabe von FDP bewirkte die Wiederherstellung der vollen Aktivität (s.Tab.7).

Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, daß FDP im zellfreien Extrakt z.T. noch an die LDH gebunden war und bei Temperaturerhöhung entbunden wurde. Versuche, den FDP-Gehalt im zellfreien Extrakt zu bestimmen, mißlangen. Die FDP-Konzentration lag unterhalb der Nachweisgrenze.

Durch Dialyse des zellfreien Extraktes konnte FDP offenbar vollständig entfernt werden, da ohne FDP keine Aktivität vorhanden war. Die vor der Dialyse gefundene Restaktivität war auf 0 gesunken; mit FDP konnte die ursprüngliche Aktivität wieder hergestellt werden.

FDP ist also ein essentieller Aktivator. Die im nichtdialysierten zellfreien Extrakt gefundene Restaktivität ist vermutlich auf jenen Teil der L-LDH zurückzuführen, der FDP noch gebunden hat. Der endgültige Beweis wäre allerdings erst dann erbracht, wenn man das an die LDH gebundene FDP nachweisen könnte.

Tab.7: Aktivierung der L-LDH im zellfreien Extrakt durch FDP in Abhängigkeit von Temperatur und Dialyse.

	Units/ml im zellfreien Extrakt		Aktivierungsfaktor durch FDP
	- FDP (Restaktivität)	+	
4°C	7,2	19,5	2,7
25°C (30 Minuten)	2,4	19,0	7,9
Dialyse (16 h)	0	18,5	100

Die in Tabelle 7 aufgeführten Werte stellen ein repräsentatives Beispiel eines zellfreien Extraktes dar. Die Zellen waren dabei in HD-Medium anaerob angezogen, und am Ende der logarithmischen Phase geerntet worden. Wie später noch gezeigt werden wird

(s.16.), haben auch der Glucosegehalt im Medium und der Zeitpunkt des Erntens einen gewissen Einfluß auf die FDP-Aktivierbarkeit der LDH im zellfreien Extrakt.

6.2. Aktivatorspezifität

FDP scheint ein sehr spezifischer Aktivator zu sein, da die nachfolgend aufgeführten Phosphatverbindungen in einer Endkonzentration von 8 mM keine aktivierende Wirkung aufweisen:

- | | |
|-----------------|--------------------|
| a) Fructose | g) NADP^+ |
| b) Fructose-1-P | h) PEP |
| c) Fructose-6-P | i) AMP |
| d) 6-P-Gluconat | k) ATP |
| e) Acetyl-P | l) ADP |
| f) Glucose-6-P | |

Von diesen Phosphatverbindungen hatte ADP und ATP eine stark hemmende Wirkung (s.11.3.3.).

Verschiedene Autoren fanden bei FDP-aktivierbaren LDHs, daß unter bestimmten Bedingungen FDP nicht unbedingt für die Aktivität der LDH erforderlich ist. Bei der FDP-aktivierbaren LDH von Acholeplasma laidlawii Typ A (Neimark und Lemcke, 1972), konnte durch Erhöhung der Pyruvatkonzentration die Aktivierbarkeit durch FDP vollständig aufgehoben werden. Auch bei einem pH um 5,0 war FDP für die LDH-Aktivität überflüssig.

Im Gegensatz dazu ist die L-LDH von S. epidermidis gänzlich FDP-abhängig. Weder durch Erhöhung der Pyruvatkonzentration (auf 10 mM) noch durch pH-Änderung wird die Abhängigkeit der LDH-Aktivität von FDP aufgehoben.

7. Kosubstrat- und Substratspezifität

Das gereinigte Enzym kann nur NADH/H^+ oder NAD^+ als Kosubstrat verwenden, nicht jedoch NADPH/H^+ bzw. NADP^+ . Die FDP-aktivierbare LDH ist spezifisch für das L-(+)-Laktatisomer. Bei der

Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb.12) erscheinen bei der Aktivitätsfärbung nur Banden mit L-Laktat bzw. Pyruvat, jedoch keine mit D-Laktat als Substrat.

Die Oxidation von L-Laktat zu Pyruvat (Rückreaktion) ist sehr gering und ist im optischen Test (MM 23.2) auch bei sehr hohen Konzentrationen an L-Laktat und NAD^+ kaum meßbar, so daß die physiologische Funktion der FDP-aktivierbaren L-LDH die einer 'Pyruvatreduktase' ist.

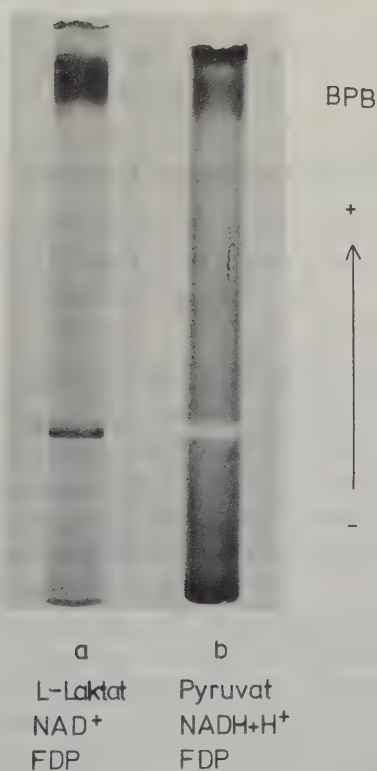


Abb. 12:

Diskelektrophorese der S.epidermidis-LDH mit Aktivitätsfärbung. Pro Gel wurden ca. 1-2 μg Protein der angereicherten L-LDH-Lösung aufgetragen.

8. pH-Optimum

Bei der Bestimmung des pH-Optimums wurde überprüft, ob auch in Abwesenheit von FDP die LDH-Aktivität durch die Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst wird. Ohne FDP jedoch war das Enzym über das gesamte pH-Spektrum inaktiv.

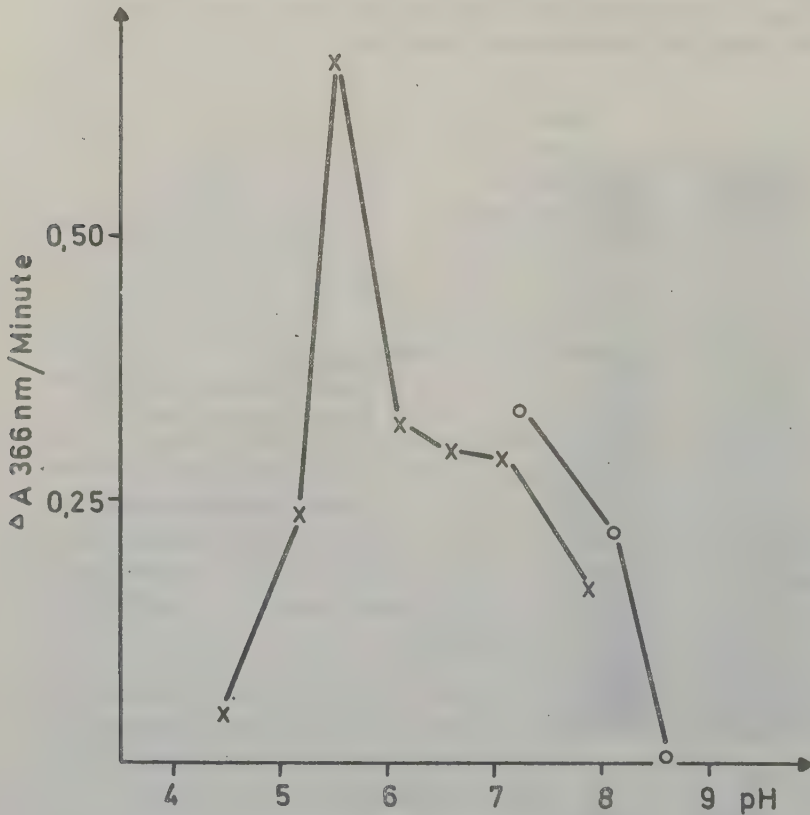


Abb.13:

Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der L-LDH von S.epidermidis.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in der Pyruvat-NADH-Reaktion (MM 23.1.), wobei bei jedem pH-Wert zwei Bestimmungen durchgeführt wurden, nämlich einmal mit und einmal ohne FDP. Als Enzymlösung wurde dialysierte AS-Fällung (50-70 %, 1:10 verdünnt) verwendet.

Symbole: (x) 0,1 M Phosphatpuffer und (o) 0,1 M Tris/HCl Puffer.

Damit unterschied sich die S. epidermidis-LDH von den ebenfalls FDP-aktivierbaren L-LDHs aus Lactobacillus casei und L. curvatus, die im Bereich ihres pH-Optimums (pH 4,8) auch ohne Mn^{2+} und FDP annähernd die gleiche Aktivität aufwiesen, wie in Gegenwart von FDP oder Mn^{2+} (Stetter, 1973).

Das pH-Optimum der S. epidermidis-LDH lag etwa bei, pH 5,6 (Abb.13). Ebenfalls in diesem sauren pH-Bereich, zwischen 5,0 und 5,5 lagen die pH-Optima der FDP-aktivierbaren L-LDHs einiger Vertreter von S. intermedius und außerdem noch M. kristinae ATCC 27570 und M. varians CCM 884.

Bei pH 4,0 und 8,5 ist die S. epidermidis-LDH bereits völlig inaktiv.

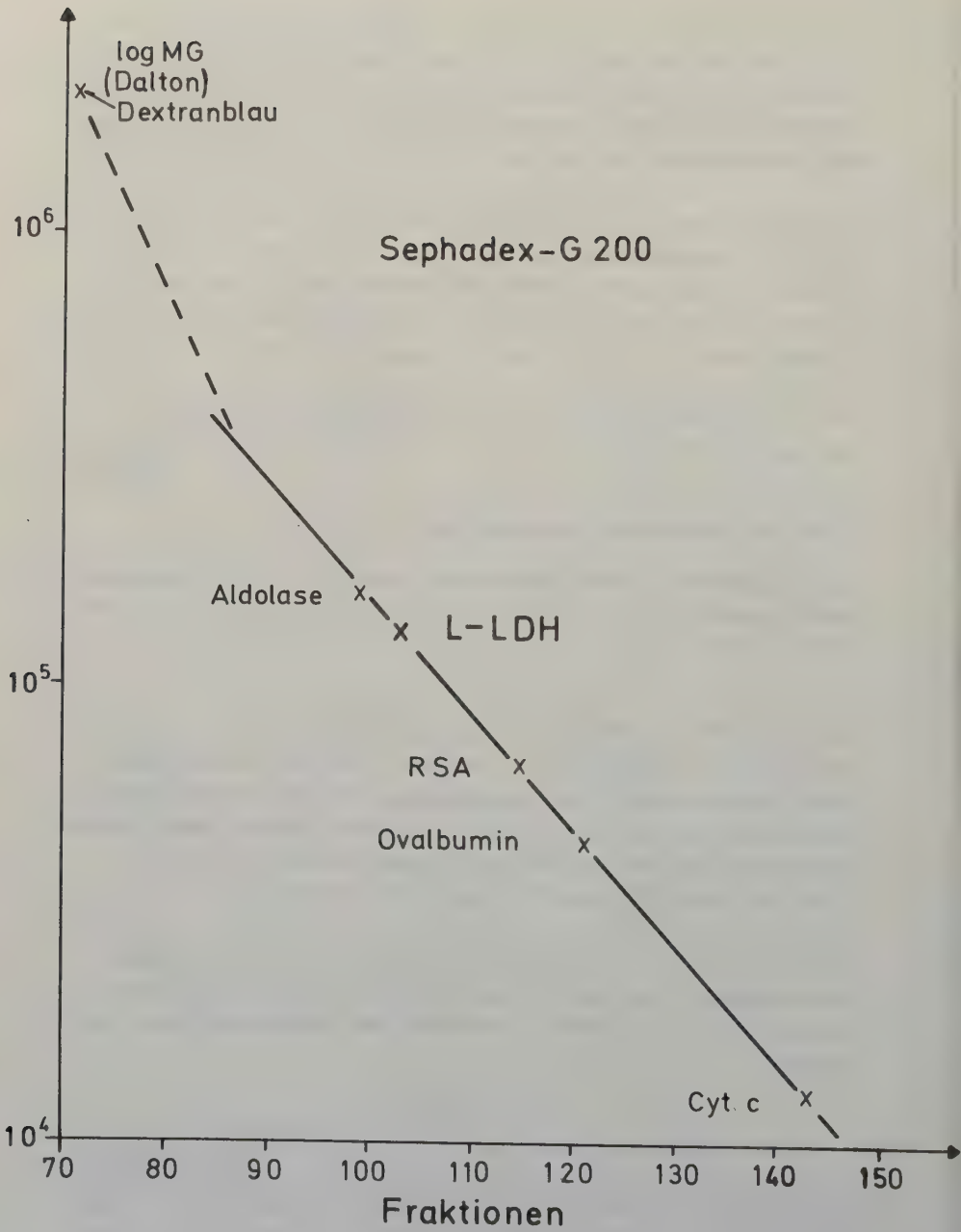
9. Molekulargewichtsbestimmungen

Die Molekulargewichtsbestimmungen brachten einige interessante Anhaltspunkte, die Aufschluß über die Wirkungsweise von FDP (und $NADH/H^+$) geben.

9.1. Säulenchromatographie mit Sephadexgel G 200

Wie bereits erwähnt, konnte anfangs nach einem Säulenlauf keine LDH-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Durch den Verdünnungseffekt war die L-LDH inaktiviert worden. Erst durch die Zugabe von FDP und $NADH/H^+$ konnte die Position der L-LDH im Aktivitätstest nachgewiesen werden.

Wie aus Abb. 14 zu entnehmen ist, ergab sich für die FDP-aktivierbare L-LDH ein Molekulargewicht von ca. 130 000. Dieses Molekulargewicht entspricht der tetrameren Form der L-LDH.



9.2. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese

Die gereinigte LDH, die elektrophoretisch annähernd homogen war (s. Abb. 11), wurde für die SDS-Gelelektrophorese verwendet. Als Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung dienten Katalase, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A und Cytochrom c. Für die Eichkurve wurden die bei Weber und Osborn (1969) angegebenen Molekulargewichtswerte zugrundegelegt.

In der elektrophoretischen Auftrennung erschien bei der LDH eine starke Proteinbande mit einer relativen Mobilität von 0,5. Dies entspricht einem relativen Molekulargewicht von ca. 36 000.

Aus diesem Ergebnis geht erstens hervor, daß die L-LDH aus 4 Untereinheiten besteht und zweitens, daß die 4 Untereinheiten gleiches Molekulargewicht aufweisen. Abb. 15 zeigt die halblogarithmische Darstellung von Molekulargewicht und relativer Mobilität der Standardproteine und der L-LDH.

Abb. 14:

Molekulargewichtsbestimmung mit Sephadexgel G 200. Für die FDP-aktivierbare L-LDH aus S.epidermidis ergab sich ein Molekulargewicht von 130 000 Dalton.
RSA = Rinderserumalbumin, Cyt.c = Cytochrom c,
MG = Molekulargewicht.

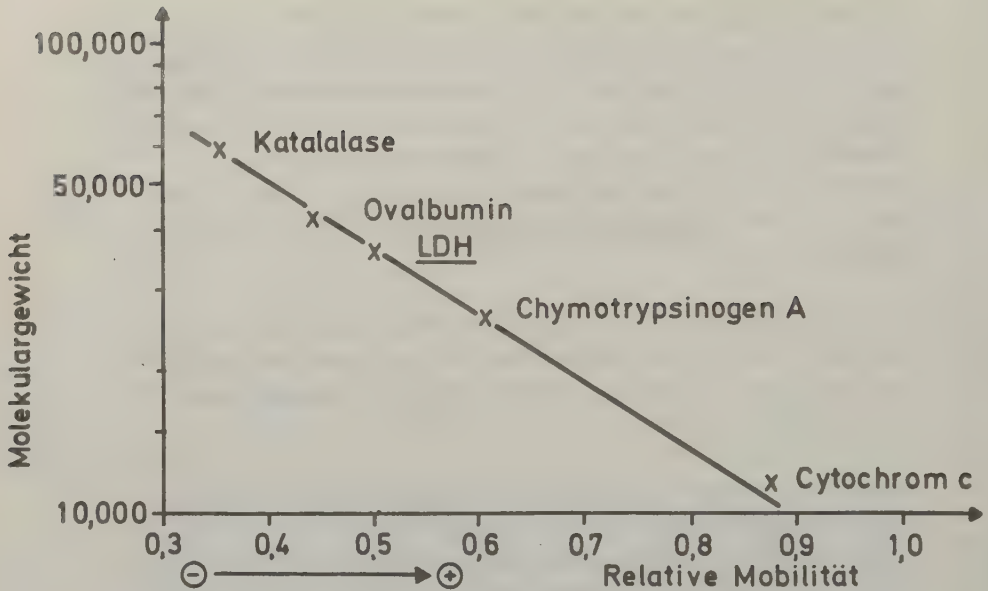


Abb. 15:

Molekulargewichtsbestimmung mit SDS-Plattengelelektrophorese. In die Taschen des Plattengels wurden jeweils 10 μ l Proteinlösung (0,5 - 1,0 μ g Protein) aufgetragen. Die LDH war über Affinitätschromatographie gereinigt worden.

9.3. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDZ)

9.3.1. SDZ in Gegenwart von FDP und NADH/H⁺

Bei der Molekulargewichtsbestimmung mittels SDZ wurde neben Ovalbumin (MG 45 000) hauptsächlich ADH (Alkohol-Dehydrogenase) aus Hefe (MG 141 000) als Standardprotein verwendet. ADH hat die Vorteile, daß es ein ähnliches Molekulargewicht wie die LDH besitzt, und daß die Positionen beider Enzyme im Aktivitätstest gut nebeneinander ermittelt werden können.

Um die tetramere Form der L-LDH zu erhalten, mußte der Zentrifugenlauf in Gegenwart von FDP durchgeführt werden. Abb.16 zeigt ein Verteilungsmuster der Aktivitäten von L-LDH und ADH nach einem Zentrifugenlauf. Der Gradient

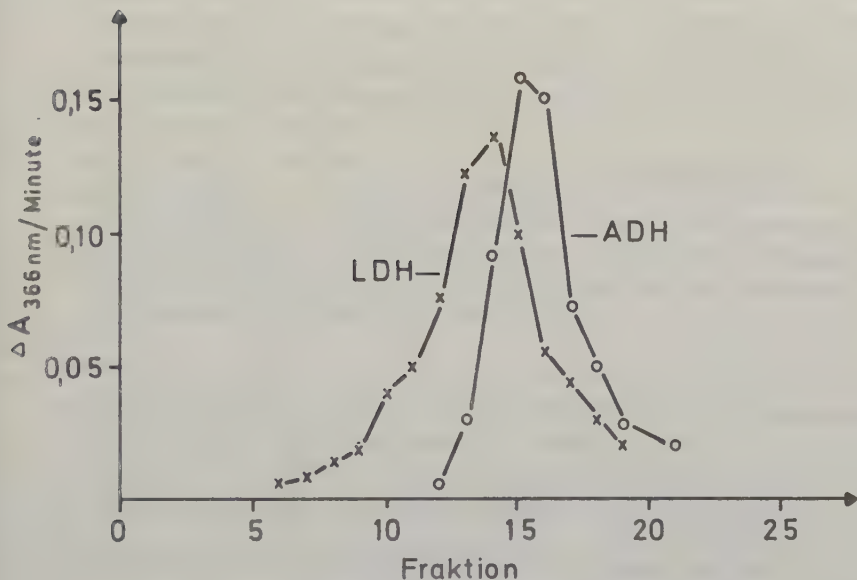


Abb.16:

Aktivitätsmuster der FDP-aktivierbaren L-LDH aus S.epidermidis ATCC 14990 und der ADH aus Hefe nach einem Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugenlauf.

Der Saccharosegradient und die Probenlösung enthielten zusätzlich noch FDP und NADH/H⁺ zur Stabilisierung der L-LDH.

Auf den Gradienten wurden 0,1 ml Probenlösung aufgetragen, die sich wie folgt zusammensetzt:

- 0,09 ml zellfreier Extrakt (Proteingehalt ca. 0,13 mg), 16 Stunden dialysiert in 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,2. Diese Proteinlösung enthielt zusätzlich noch 4 mM FDP und 2 mM NADH/H⁺ und
- 0,01 ml ADH aus Hefe (1:40 verdünnt).

Das Molekulargewicht beträgt nach der Annäherungsformel von Martin und Ames (1961): $(14/15)^{1,5} \times 141\ 000 = \underline{127.137}$ Daltons.

umfaßte insgesamt 26 Fraktionen. Zur Stabilisierung der L-LDH enthielten Probenlösung und Saccharosegradient FDP und NADH/H^+ . Der zellfreie Extrakt war vorher dialysiert worden, und die L-LDH war im Aktivitätstest gänzlich FDP-abhängig.

Für die LDH ergab sich dabei ein Molekulargewicht von abgerundet 127 000. Es lag damit in der gleichen Größenordnung wie es bei der Sephadexgelchromatographie G 200 gefunden wurde.

2.3.2. SDZ in Abwesenheit von FDP und NADH/H^+

Der gleiche, dialysierte, zellfreie Extrakt (wie oben) war in einem weiteren Zentrifugenröhrchen aufgetragen worden. Im Gegensatz zu oben waren jedoch weder in der Probenlösung noch im Saccharosegradienten FDP oder NADH/H^+ enthalten.

Nach der Fraktionierung dieses Gradienten wurden die einzelnen Fraktionen (3 Tropfen/Fraktion) mit 20 μl einer 10 mM FDP-Lösung versetzt. Nach etwa 1/2 Stunde wurde der Aktivitätstest auf LDH und ADH durchgeführt. Abb. 17 zeigt das Verteilungsmuster der Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen.

Die LDH ist hier bezüglich ihres Molekulargewichtes aufgespalten in eine Hauptkomponente mit einem Molekulargewicht von ca. 39 000 (s. Abb. 17 I) und eine kleinere Komponente mit einem Molekulargewicht von ca. 72 000 (s. Abb. 17 II). In Abwesenheit von FDP und NADH/H^+ liegt die L-LDH in Monomere und Dimere dissoziiert vor. Bemerkenswert an diesem Ergebnis ist, daß

- a) die L-LDH bereits bei einem pH von 6,2 (in Abwesenheit des Aktivators) in Untereinheiten dissoziiert ist und daß
- b) durch Einwirken von FDP die Untereinheiten reaktiviert werden können.

Die Säugetier-LDHs dissoziieren erst bei einem pH-Wert zwischen 4 und 5 unter Verwendung bestimmter Anionen in Dimere und Monomere (Lovell und Winzor, 1974 und Rudolph und Jaenicke, 1976).

Ohne vorherige Inkubation mit FDP sind in den einzelnen Fraktionen nur Spuren von LDH-Aktivität nachweisbar. Die Vorinkubation mit FDP bewirkt, daß die Monomeren reaktiviert werden. Dieser Prozeß ist offensichtlich zeitabhängig, da ohne Vorinkubation im optischen Test (MM 23.1.) also in Gegenwart von FDP, keine oder nur eine sehr geringe Aktivität nachzuweisen ist. Daß die Reaktivierung der L-LDH durch FDP zeitabhängig ist (d.h. daß sie langsam erfolgt), geht auch aus Abschnitt 11.2. hervor. Hier wird in einer Zeit-Umsatz-Kurve gezeigt, daß bis zu 5 Minuten verstreichen können, bis das Fließgleichgewicht ("steady state") erreicht ist. Ob die Reaktivierung der L-LDH durch FDP in einer Konformationsänderung zum aktiven Monomer oder in einer Reassoziierung zum aktiven Dimer bzw. Tetramer besteht, kann noch nicht mit endgültiger Sicherheit beantwortet werden.

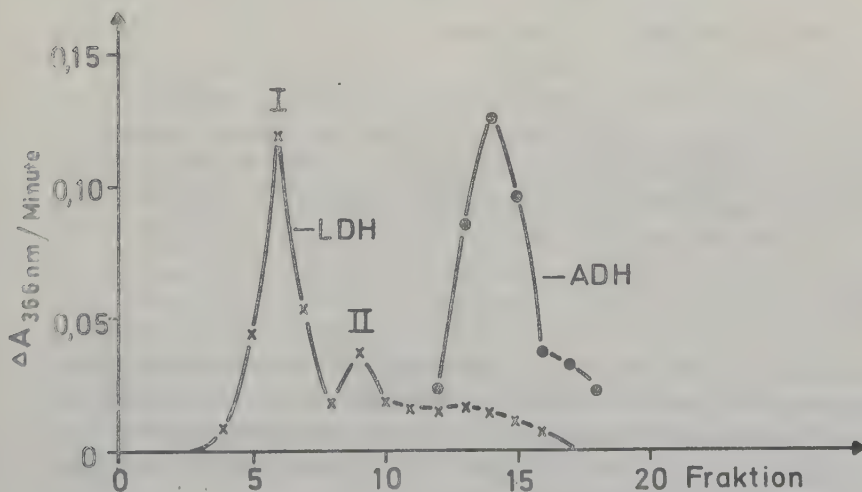


Abb. 17:

Aktivitätsverteilung nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation mit den gleichen Enzymen wie in Abb. 16. Lediglich FDP und NADH/H⁺ waren aus dem Gradienten und der Probelösung weggelassen worden; Peak I entspricht einem Molekulargewicht von 39 000 und Peak II einem Molekulargewicht von 72 000 Daltons.

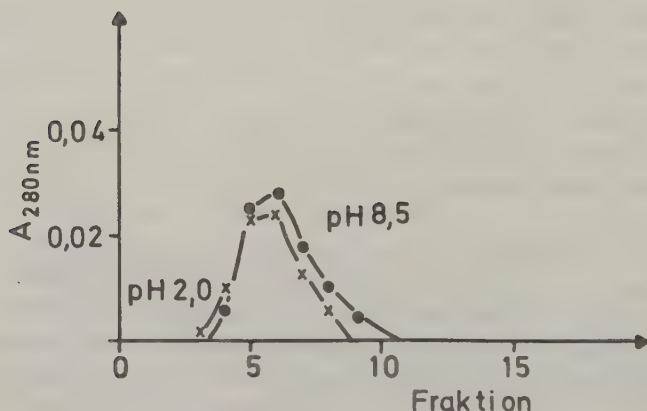


Abb. 18:

Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation mit gereinigter LDH.

Die Probelösung und der Saccharosegradient wurden einmal mit 0,1 M HCl/KCl-Puffer, pH 2,0 und zum anderen mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,5 auf den entsprechenden pH-Wert gebracht. Die Position der inaktiven LDH wurde durch Proteinmessung bei 280 nm ermittelt. Von der gereinigten L-LDH wurden 0,1 ml (ca. 5-8 µg Protein) aufgetragen. Auch hier ergibt sich ein Molekulargewicht von 39 000 Daltons.

Es steht jedoch fest, daß beide Komponenten gemeinsam (FDP und NADH/H⁺ eine Reassoziierung der Mono- und Dimeren zum aktiven Tetramer bewirken (s. Abb. 16). Sind jedoch die struktur- und konformationserhaltenden Komponenten abwesend, so zerfällt die L-LDH in Untereinheiten.

2.3.3. SDZ bei pH 2,0 und pH 8,5

Normalerweise dissoziiert die L-LDH nur im sauren pH-Bereich (pH 2-3) in ihre Untereinheiten (Chilson et al., 1965). Die Inaktivierung der L-LDH bei pH 8,5 (Abb. 13) führte zu der Frage,

ob dieser Aktivitätsverlust ebenfalls auf eine Dissoziation zurückzuführen ist.

Durch Affinitätschromatographie gereinigte L-LDH, die noch 2 mM FDP enthielt, wurde auf pH 2,0 bzw. 8,5 gebracht. Beide Enzymlösungen waren nach dieser Behandlung vollkommen inaktiv. Die anschließende SDZ, bei der die Saccharosegradienten auf den gleichen pH-Wert gebracht worden waren wie die Enzymlösungen, ergab das in Abb. 18 wiedergegebene Verteilungsmuster.

Die Position der L-LDH in den einzelnen Fraktionen wurde diesmal durch Proteinabsorption bei 280 nm ermittelt. Die ADH, deren Position erfahrungsgemäß sehr konstant war (Fraktion 14/15), wurde bei diesem Zentrifugenlauf nicht mit aufgetragen, damit der geringe Proteingehalt der L-LDH-Lösung nicht überlagert wurde. Die Auswertung des Zentrifugenlaufes ergab sowohl bei pH 2,0 als auch 8,5 Proteinpeaks in einem Molekulargewichtsbereich um 39 000.

Bei beiden pH-Werten erfolgte eine Dissoziation der L-LDH in ihre Untereinheiten. Ob eine Reaktivierung der LDH möglich ist, nachdem sie diesen pH-Werten ausgesetzt war, wurde nicht untersucht.

Die Diskrepanz im Molekulargewicht - bei der SDS-Gelelektrophorese wurde ein Molekulargewicht von 36 000 erzielt und bei der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDZ) ergab sich ein Molekulargewicht von 39 000 - ist wohl auf die etwas ungenauere SDZ-Methode zurückzuführen, bei der Standardprotein und Monomer in ihrem Molekulargewicht stark differieren.

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der angewandten Methoden und Variationen der Molekulargewichtsbestimmung und die daraus resultierenden Daltons der LDH.

Tab.8: Übersicht über die Molekulargewichtsbestimmung der FDP-aktivierbaren L-LDH aus S. epidermidis ATCC 14990.

Methoden	Molekulargewicht (Daltons)
1. Sephadexgelfiltration G 200 (+ FDP und NADH/H ⁺)	130 000
2. SDS-Gelelektrophorese	36 000
3. Saccharose-Dichtegradienten- Zentrifugation (SDZ)	
a) + FDP und NADH	130 000
b) - FDP und NADH	72 000 und 39 000
c) pH 2,0 und 8,5	39 000

10. Temperatur-Optimum

Gerade hinsichtlich der anomalen Kinetik dieser L-LDH war der Einfluß der Temperatur auf die Aktivität und das Temperatur-optimum von besonderem Interesse.

Empirisch hat man gefunden, daß eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante k von der reziproken absoluten Temperatur T besteht. Mathematisch ausgedrückt erhält man diesen linearen Zusammenhang in einer Ableitung der Arrheniusgleichung:

$$\log k = \log A \times \frac{-E}{2,303 \times R} \times \frac{1}{T} ;$$

k = Geschwindigkeitskonstante;

A = Arrheniuskonstante, sie beinhaltet die Entropie der Aktivierung;

E = Enthalpie der Aktivierung ($E = \Delta H + RT$), E (Aktivierungsenergie) kann experimentell ermittelt werden;

$2,303 \times R$ ergibt den Wert von $4,576 \text{ cal Mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$;

$E = - (- n \times 4,576) \text{ cal/Mol}$;

Wie aus Abb. 19 hervorgeht, ergibt sich für n ein Wert von $-1,9 \times 10^3$. Die Aktivierungsenergie beträgt demnach 8,7 kcal/Mol.

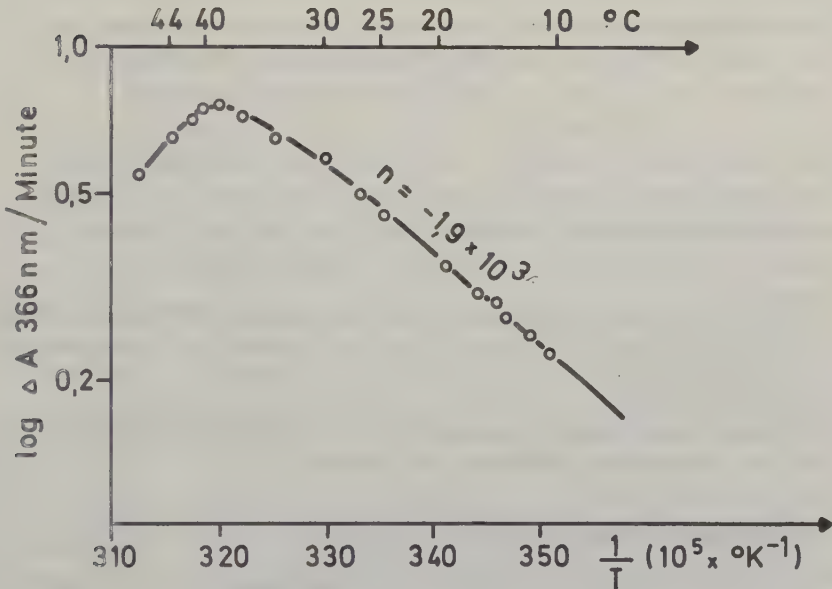


Abb. 19:

Arrhenius-Diagramm. Auf der Ordinate ist $\log V_{\max}$ und auf der Abszisse $1/T$ aufgetragen. Bis 30°C liegt eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus $V_{\max}$ von der reziproken absoluten Temperatur vor. Für diesen Abschnitt ergibt sich eine Steigung von $-1,9 \times 10^3$.

Aufgrund dieser Arrhenius-Auftragung kann man unter anderem auch feststellen, ob sich durch Abweichung von der Linearität bei erhöhter Temperatur die wirksame Enzymkonzentration ändert.

Solche Änderungen der katalytisch aktiven Enzymkonzentrationen können nach Talsky (1971) in einer Konformationsumwandlung oder aber auch in einer Dissoziation von oligomeren Enzymen bestehen.

Bei vielen enzymkatalysierten Reaktionen erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10° etwa auf das 2-fache ($Q_{10} \approx 2,0$), wobei der Temperaturkoeffizient Q_{10} von der Aktivierungsenergie abhängt.

Für die FDP-aktivierbare L-LDH hat sich ein Q_{10} -Wert ($15-25^{\circ}\text{C}$) von 1,7 und ($30-40^{\circ}\text{C}$) von 1,25 ergeben. Dieser Unterschied entsteht dadurch, daß zum Temperaturoptimum hin zwei Prozesse um die Vorherrschaft konkurrieren :

- a) die allgemeine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und
- b) die zunehmende Denaturierung des Enzyms mit steigender Temperatur.

Am Temperaturoptimum, das für die L-LDH bei etwa 40°C liegt, halten sich beide Einflüsse die Waage.

11. Das kinetische Verhalten der LDH

Die FDP-aktivierbare L-LDH von S. epidermidis ist ein allosterisches Enzym. Neben katalytischen Zentren, an die Substrat und Coenzym gebunden werden, existieren noch, räumlich getrennt davon, ein oder mehrere allosterische Zentren, die spezifisch mit dem Aktivator FDP reagieren. Das allosterische Zentrum ist zwar nicht unmittelbar an der katalytischen Reaktion des Enzyms beteiligt, aber im Falle der FDP-aktivierbaren L-LDH wird die katalytische Aktivität durch die Bindung von FDP an das allosterische Zentrum stimuliert bzw. überhaupt erst ermöglicht.

Die Sättigungskurven der L-LDH mit Pyruvat, NADH/H^{+} und dem Aktivator FDP weisen mehrere intermediäre Plateaus auf.

Die L-LDH folgt nicht der normalen Michaelis-Menten-Kinetik, und es ist daher auch nicht möglich, den K_m -Wert aus dem nichtlinearen Kurvenverlauf der Lineweaver-Burk-Auftragung zu ermitteln. Man ist daher übereingekommen, bei allosterischen Enzymen den Ausdruck $(M)_{0,5 v}$ (Atkinson, 1966) für die Substrat- oder Effektorkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit zu verwenden. $(M)_{0,5 v}$ entspricht dem K_m -Wert, wenn Michaelis-Menten-Kinetik vorliegt.

11.1. Reaktion der L-LDH mit FDP (FDP-Variation)

11.1.1. FDP-Sättigungskurve

Die Sättigungskurven mit FDP haben einen stufenförmigen Verlauf, der intermediäre Plateaus aufweist (Teipel und Koshland Jr., 1969). Möglicherweise sind diese intermediären Plateaus auf das Zusammenwirken von positiver und negativer Kooperativität zurückzuführen (Götz, 1975). Abbildung 20 zeigt die Aktivatorsättigungskurve bei einer Reaktionstemperatur von 25°C und 38°C. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur ändert jedoch das charakteristische Aussehen dieser Kurve nicht.

Um zufällige Meßfehler auszuschließen, wurden bei 25°C jeweils 2 Parallelproben getestet und die 3 Werte durch die Vertikallinie verbunden. Diese Testserien für die kinetischen Messungen wurden mit 0,1 M K, Na-Phosphatpuffer pH 5,6 (pH-Optimum) durchgeführt. Daneben wurde aber auch noch Imidazolpuffer pH 6,3 (s. MM 23.1.) getestet, wodurch jedoch der Verlauf der Kurven nicht wesentlich verändert wurde.

Wenn man von diesen Plateaus einmal absieht, so fällt auf, daß die FDP-Sättigungskurve in Abb. 20 A mit einer sigmoiden Anlaufphase beginnt, die bei NADH/H⁺ (Abb. 23 A) und Pyruvat (Abb. 24 A) fehlt. Ein sigmoider Kurvenverlauf ist charakteristisch für allosterische Enzyme. Er besagt, daß eine positive Kooperativität vorliegt. Das heißt, wenn ein Enzym mehrere Bindungsstellen für einen Liganden besitzt, so wird nach

Bindung des 1. Liganden die Bindung der weiteren Liganden erleichtert.

Der sich aus der FDP-Sättigungskurve ergebende $(M)_{0,5 \text{ v}}$ -Wert für FDP beträgt 0,15 mM.

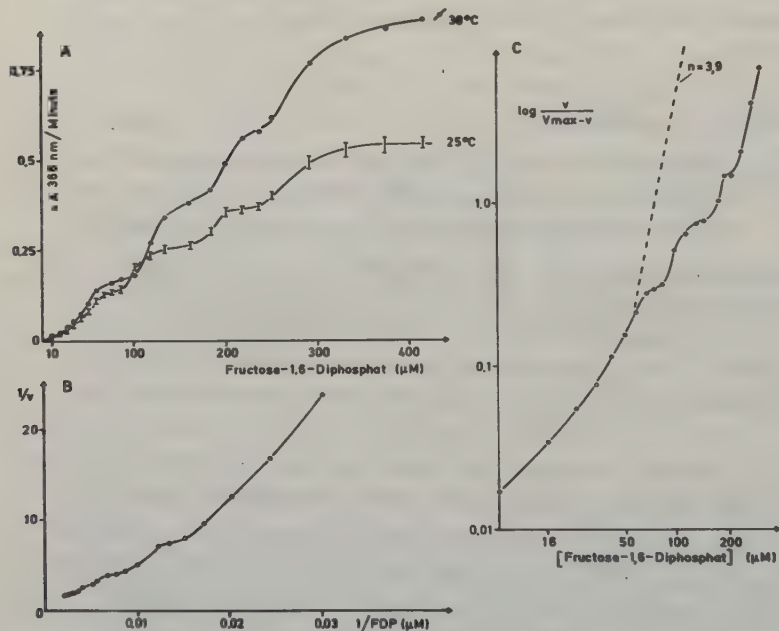


Abb. 20:

- (A) FDP-Sättigungskurven bei 25°C und 38°C.
Für die Aufstellung dieser Kinetiken wurde 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,6 verwendet. Das Volumen in der Küvette wurde mit Puffer ausgeglichen und war somit stets einheitlich. Jede Reaktion wurde mit 0,5 μg Protein einer gereinigten, dialysierten Enzymlösung gestartet. Die FDP-Konzentration wurde wie angegeben variiert. Die Vertikallinien in der 25°C-Kurve geben die experimentelle Abweichung aus drei Messungen wieder.
- (B) Lineweaver-Burk-Auftragung.
Es liegen die Werte aus Abb. 20 A bei 25°C zugrunde.
- (C) Hill-Auftragung.
Auch hier liegen die Werte, die bei 25°C gemessen wurden, zugrunde.

11.1.2. Darstellung nach Lineweaver und Burk (FDP)

Ein weiteres Indiz für das Vorliegen einer positiven Kooperativität ist der aufwärts gekrümmte Kurvenverlauf in der Lineweaver-Burk-Auftragung (Abb. 2o B). Eine negative Kooperativität würde einen abwärts gebogenen Kurvenverlauf und die Michaelis-Menten-Kinetik eine Gerade ergeben. Der K_m -Wert kann aufgrund des gekrümmten Verlaufs der Kurve nicht ermittelt werden.

11.1.3. Die Hill-Auftragung (FDP)

Im Hill-Diagramm wird der Logarithmus ($v/V_{max}-v$) gegen den Logarithmus der Ligandenkonzentration aufgetragen. Man erhält normalerweise eine Gerade mit der Steigung n . Sie wird als Hillkoeffizient (n_H) bezeichnet. Der Hillkoeffizient drückt zweierlei aus: Er gibt einmal die Mindestanzahl der Ligandenbindungsstellen am Enzym an und stellt zum anderen ein Maß für die Wechselbeziehungen zwischen den Untereinheiten und Bindungszentren - und damit auch für die Kooperativität - dar.

Eine positive Kooperativität liegt dann vor, wenn der n_H -Wert größer als 1 ist. Bei einer negativen Kooperativität ist der n_H -Wert kleiner als 1. Wenn $n_H = 1$ ist, handelt es sich um eine normale Michaelis-Menten-Kinetik.

Abb. 2o C zeigt die Hillauftragung für FDP. Die gleichen Plateaus, wie sie bei der FDP-Sättigungskurve (Abb. 2o A) auftreten, stören auch hier den Kurvenverlauf. Läßt man die Plateaus einmal ausser acht, die eigentlich nur eine Verschiebung nach rechts bewirken, aber die Steilheit der Kurve nicht verändern können, so erhält man eine Gerade, wie sie durch die gestrichelte Linie angedeutet ist. Der n_H -Wert dieser Geraden ist 3,9.

Der Anstieg im unteren Teil des Kurvenverlaufs rührt von der Sigmoidität der FDP-Sättigungskurve (Abb. 2o A) her. Ein Hillkoeffizient von 3,9 bedeutet, daß

- a) mindestens 4 Bindungsstellen für FDP an der LDH vorhanden sind und
- b) eine positive Kooperativität mit einer relativ hohen Wechselwirkung zwischen Untereinheiten und Bindungszentren vorliegt.

Eine Deutung der Plateaus bei der FDP-Sättigungskurve (Abb. 2o A), die sich auch in den Abb. 2o B und C widerspiegeln, ist schwierig. Allem Anschein nach handelt es sich um Einflüsse, die immer wieder zur Hemmung der katalytischen Aktivität führen. Möglicherweise sind diese Einflüsse auf NADH/H^+ zurückzuführen, das sich offensichtlich durch einen Wechsel in der Kooperativität auszeichnet (s. Abb. 23).

11.2. Einfluß von FDP auf die Zeit-Umsatz-Kurve

Abb. 21 zeigt den typischen Kurvenverlauf der L-LDH-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit. Die Enzymreaktion wurde dabei durch Zugabe von FDP ausgelöst (Testansatz s. MM 23.1.). Die Reaktionsgeschwindigkeit der L-LDH nimmt hier kontinuierlich zu, bis sie nach ca. 4 Minuten einen linearen Verlauf annimmt. Die katalytische Aktivität der L-LDH wird vom Zeitpunkt 0 an allmählich beschleunigt, um dann im linearen Bereich eine konstante Umsatzrate zu erreichen. Der lineare Bereich wird in der Enzymkinetik auch als "steady state" bezeichnet. Die Zunahme des Produkts bzw. die Abnahme des Substrats erreicht hier einen konstanten Wert.

Diese Anlaufphase tritt nur bei der dialysierten L-LDH-Lösung auf. Inkubiert man diese L-LDH-Lösung vorher einige Minuten mit FDP, so ist der Kurvenverlauf von Anfang an linear.

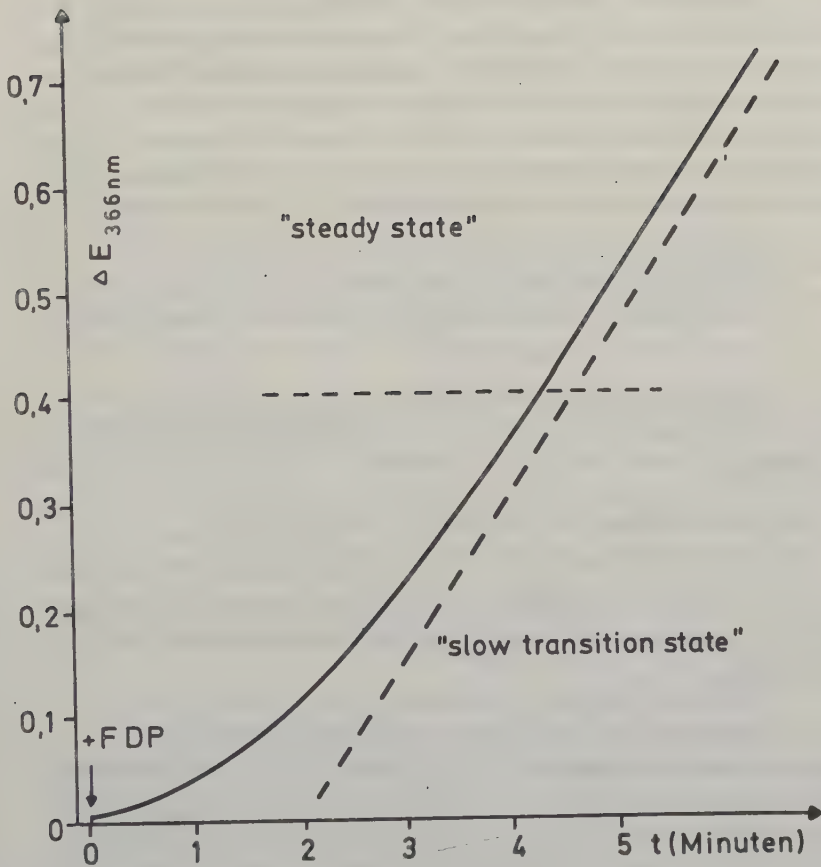


Abb. 21:

Zeit-Umsatz-Kurve mit einer dialysierten LDH-Lösung. Die Reaktion (Testansatz s. MM 23.1.) wurde durch Zugabe von FDP gestartet. Mit einem Eppendorf-Kompensationsschreiber wurde kontinuierlich die Zunahme der LDH-Aktivität mit der Zeit verfolgt.

Die Anlaufphase oder "slow-transition-state" - ein Begriff, der durch Ainslie, Shill und Neet (1972) in der Literatur Eingang gefunden hat - wird von den Autoren so erklärt, daß ein Reaktionsschritt zur Erzeugung der katalytischen Aktivität äußerst langsam erfolgt. Auch Frieden (1970) postuliert in "The hysteretic enzyme concept" einen langsamen Wechsel der Enzymaktivität unter dem Einfluß von Liganden. Solch langsame Reaktionsschritte können sein :

- a) Isomerisierung (Konformationsänderung),
- b) Dissoziierung-Assoziierung oder
- c) die Bindung eines Effektors (Inhibitor oder Aktivator) an das Enzym.

Bei der FDP-aktivierbaren L-LDH von S. epidermidis bieten sich 2 Reaktionsschritte an, die langsam und damit geschwindigkeitsbestimmend sein können.

1. Die Bindung von FDP an das Monomer und
2. Die Reassoziierungsschritte zum Tetramer.

Die hierbei auftretenden Konformationsänderungen sind sekundär, d.h. sie sind als eine Folge der Punkte 1 und 2 zu betrachten.

Das Verschwinden der Anlaufphase bei Vorinkubation der dialysierten Enzymlösung mit FDP beweist, daß der langsame Reaktionsschritt durch die Wechselwirkung von FDP und LDH-Untereinheit ausgelöst werden muß. Wenn man die Zeit-Umsatz-Kurve (Abb.21) und die FDP-Sättigungskurve vergleicht, so fällt auf, daß beide Kurven in der Anfangsphase Sigmoidität aufweisen. Der Grund für diese Anlaufphase dürfte in beiden Fällen der gleiche sein: Es findet ein allmählicher Wechsel von einer weniger reaktionsbereiten oder reaktionsunfähigen zu einer stark reaktionsbereiten Form der LDH statt, was durch das Vorliegen einer positiven Kooperativität bestätigt wird.

Die Frage ist nun, wie dieser Wechsel von der weniger zu der stark reaktionsbereiten L-LDH zustande kommt. Die dialysierte L-LDH liegt nach der Dialyse in Untereinheiten dissoziiert vor. Durch diese Dissoziation in Untereinheiten wird jede Art von Wechselwirkung stark eingeschränkt. Durch Zugabe von FDP werden jedoch Wechselwirkungen stimuliert. Der langsame und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt dürfte die Bindung des ersten FDP-Moleküls an die reaktions-träge LDH-Untereinheit sein. Wenn aber einmal ein FDP-Molekül an die LDH-Untereinheit gebunden ist, wird die Reaktionsbereitschaft zur Reassoziierung zum Dimer und Tetramer erhöht (s. Modellvorschlag Abb. 30).

11.3. Reaktion der LDH mit NADH/H^+ (NADH/H^+ -Variation)

11.3.1. NADH/H^+ -Sättigungskurve

Auch hier wurde durch Erhöhung der Reaktionstemperatur der Verlauf der Kurve nicht verändert (s. Abb. 23 A). Im Gegensatz zur FDP-Sättigungskurve verläuft der erste Teil der Kurve nicht sigmoid, sondern hyperbolisch.

Der $(M)_{0,5 \text{ v}}$ -Wert für NADH/H^+ ist 0,05 mM.

11.3.2. Darstellung des Hemmechanismus von ADP nach Lineweaver und Burk

Die Lineweaver-Burk-Auftragung (Abb. 23 B) ergibt hier einen leicht abwärts gebogenen Kurvenverlauf, der für das Vorliegen einer negativen Kooperativität spricht.

Es wurde in dieser Auftragung auch der Hemmtyp von ADP untersucht. ADP weist die größte Hemmwirkung unter den Nukleotidphosphaten auf. Zu diesem Zweck wurde ohne (0) und mit 0,4 und 0,8 mM ADP im Testansatz die NADH/H^+ -Variation durchgeführt. Der gemeinsame Schnittpunkt auf der $1/\text{v}$ -Achse läßt auf eine kompetitive Hemmung schließen. NADH/H^+ und ADP konkurrieren um die Bindungsstelle an der L-LDH.

11.3.3. Hemmung der L-LDH-Aktivität durch Nukleotidphosphate

Eine Reihe von Nukleotidphosphaten hemmt die Aktivität der S. epidermidis-L-LDH (s. Tab. 9).

Tab.9: Einfluß der Nukleotidphosphate auf die L-LDH-Aktivität. Die verschiedenen Nukleotidphosphate waren in einer Endkonzentration von 4 mM in dem Testansatz (s. MM 23.1.) enthalten. Um pH-Differenzen auszuschließen, waren die Phosphatverbindungen (Stammlösungen) in 0,1 M Imidazolpuffer pH 6.3 gelöst. Die L-LDH-Aktivität ohne Nukleotidphosphate war 100 %. Jede Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 µg Protein einer gereinigten Enzymlösung gestartet.

Getestete Nukleotidphosphate	Endkonzentration (mM)	Hemmung der LDH-Aktivität (%)
ADP	4	100
ATP	4	36
AMP	4	31
GTP	4	10
CTP	4	5
UTP	4	4

ADP übte dabei die größte Hemmwirkung aus. Es konnte bei einer Endkonzentration von 4 mM die LDH-Aktivität vollständig hemmen. Diese Endkonzentration von 4 mM wurde deshalb gewählt, weil normalerweise die intracelluläre Adenylatkonzentration (ATP, ADP, AMP) bei 4 mM liegt (s. Hoo, 1971 und Eggleston et al., 1952). Das Verhältnis von ATP : ADP : AMP wird jedoch stark durch Wachstumsbedingungen beeinflusst.

Wie aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 23 B) hervorgeht, ist ADP ein kompetitiver Inhibitor zu NADH/H⁺. Ein Strukturvergleich von ADP und NAD (Abb.22) verdeutlicht die Ähnlichkeit beider Komponenten.

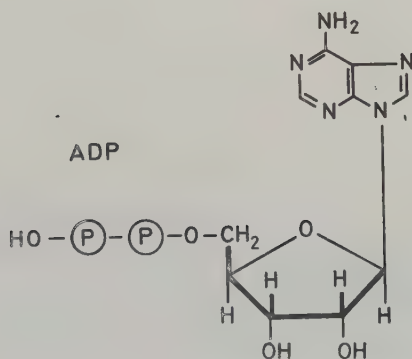
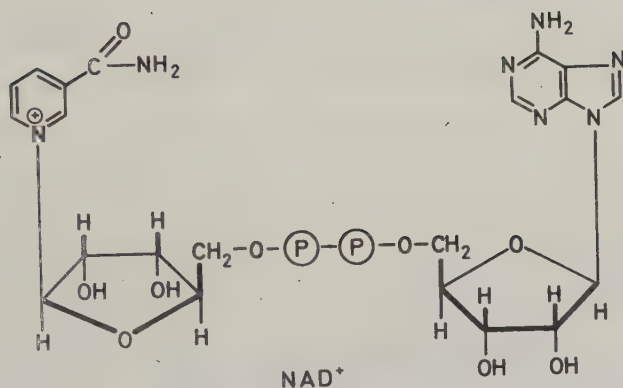


Abb. 22:

Vergleich der Strukturen von NAD und ADP.
 Offenbar ist der Diphospho-Adenosin-Rest von NAD
 Erkennungs- und Bindungsregion der L-LDH. Jede Änderung
 dieser Struktur sollte eine schlechtere Bindung hervor-
 rufen. So ist es nicht verwunderlich, daß ATP und AMP
 eine geringere Hemmwirkung aufweisen als ADP, aber immer
 noch stärker hemmen als GTP. Wenn nun allerdings die
 Purinbase durch eine Pyrimidinbase, wie Cytosin oder
 Uracil ersetzt wird, sinkt die Hemmwirkung auf 4 %.

11.3.4. Die Hill-Auftragung (NADH/H^+)

Bei der Hill-Auftragung ist ein deutlicher Wechsel in der Steigung des Kurvenverlaufs zu erkennen (Abb. 23 C).

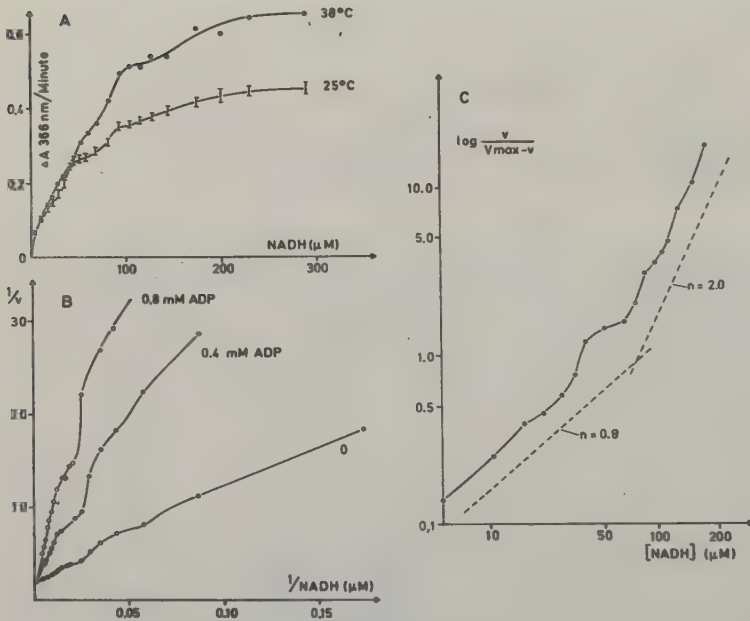


Abb. 23:

- (A) NADH/H^+ -Sättigungskurven bei 25°C und 38°C .
Für die Aufstellung dieser Kinetiken wurde 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,6 verwendet. Das Küvettenvolumen wurde mit Puffer ausgeglichen und war stets konstant. Die NADH/H^+ -Konzentration wurde wie angegeben variiert. Die FDP- und Pyruvatkonzentration blieben konstant. Die Vertikallinien geben die experimentelle Abweichung aus 3 Messungen wieder. Jede Reaktion wurde mit 0,5 μg Protein einer gereinigten, dialysierten Enzymlösung gestartet.
- (B) Lineweaver-Burk-Auftragung.
Es liegen die Werte aus Abb. 23 A bei 25°C zugrunde. Zusätzlich wurde hier der Kurvenverlauf in Gegenwart von 0,4 und 0,8 mM ADP dargestellt.
- (C) Hill-Auftragung.
Auch hier liegen die 25°C -Werte zugrunde.

Die gestrichelte Linie soll dies verdeutlichen. Der Hillkoeffizient erhöht sich dabei von $n = 0,8$ (bei niedriger NADH/H^+ -Konzentration) auf $n = 2,0$ (bei höherer NADH/H^+ -Konzentration).

Aus der Literatur sind einige Fälle bekannt, bei denen die Hill-Auftragung einen Knick aufweist. Man erklärt sich dieses Phänomen dadurch, daß ein Wechsel in der Kooperativität auftritt. Im Falle der L-LDH findet dann bei NADH/H^+ ein Wechsel von negativer ($n = 0,8$) zu positiver Kooperativität ($n = 2,0$) statt.

Der n_H -Wert von 2,0 besagt wiederum, daß mindestens 2 Bindungsstellen für NADH/H^+ vorhanden sind. Aufgrund des Vorliegens verschiedener Kooperativitäten ist allerdings hier anzunehmen, daß es sich in Wirklichkeit um mehr Bindungsstellen handelt. Dabei erschwert die Anlagerung eines NADH/H^+ -Moleküls die Anlagerung des 2., während das 3. und weitere Molekül aber bereits wieder besser gebunden wird.

11.4. Reaktion der L-LDH mit Pyruvat

11.4.1. Pyruvat-Sättigungskurve

Die Pyruvat-Sättigungskurve beginnt, wie die NADH/H^+ -Sättigungskurve, mit einem hyperbolischen Anstieg und weist im weiteren Verlauf mehrere Plateaus auf (Abb. 24 A). Auch hier konnten durch Temperaturerhöhung die Aktivitätsschwankungen nicht ausgeglichen werden.

Der $(M)_{0,5\ v}$ -Wert für Pyruvat ist etwa 1 mM.

11.4.2. Lineweaver-Burk-Diagramm und Hemmung der L-LDH-Aktivität durch Oxamat

Diese Auftragung zeigt den Kurvenverlauf sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Oxamat (0,4 mM) im Testansatz (Abb. 24 B). Der gemeinsame Schnittpunkt auf der $1/v$ -Achse weist darauf hin, daß Oxamat ein kompetitiver Inhibitor zu Pyruvat ist.

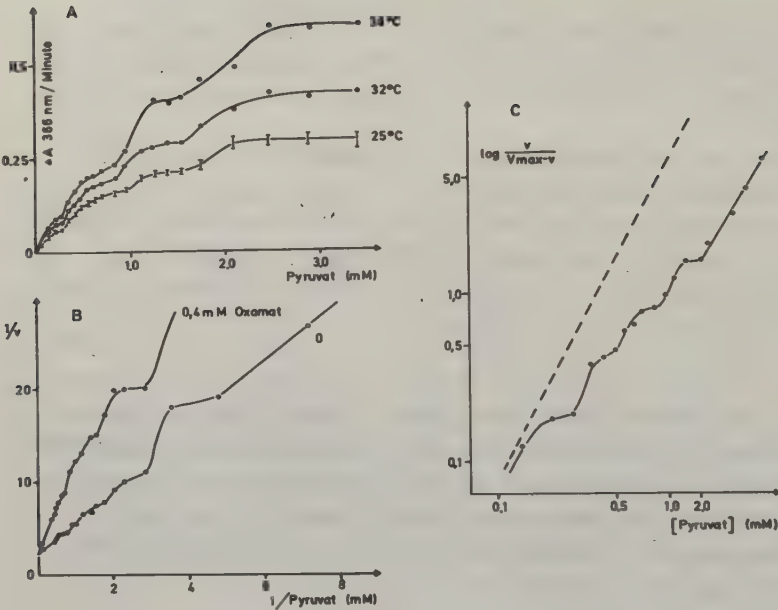


Abb. 24:

- (A) Pyruvat-Sättigungskurven bei verschiedenen Temperaturen. Auch hier wurde 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,6 verwendet und das Küvettenvolumen mit diesem Puffer konstant gehalten. Die Pyruvatkonzentration wurde wie angegeben variiert, FDP und NADH/H⁺ blieben konstant. Die Vertikallinien geben die experimentelle Abweichung aus 3 Messungen wieder. Jede Reaktion wurde mit 0,5 µg Protein einer gereinigten, dialysierten Enzymlösung gestartet.
- (B) Lineweaver-Burk-Diagramm. Auch hier liegen die Messungen aus Abb. 24 A bei 25°C zugrunde. Zusätzlich wurde hier der Kurvenverlauf in Gegenwart von 0,4 mM Oxamat dargestellt.
- (C) Hill-Auftragung mit den Werten aus 24 A bei 25°C.

11.4.3. Die Hill-Auftragung (Pyruvat)

Ähnlich wie bei FDP, erscheint auch hier der Kurvenverlauf durch die Plateaus immer wieder nach rechts versetzt, (Abb. 24 C). Die gestrichelte Gerade verdeutlicht die Steigung der Regionen zwischen den Plateaus. Die Steigung beträgt 1,6. Die Plateaus selbst besitzen eine Steigung von etwa 0,5.

Es sind auch für Pyruvat mindestens 2 Bindungsstellen am Enzym zu fordern.

11.4.4. Der Einfluß von L-Laktat und NAD^+ auf die Pyruvatreduktion der FDP-aktivierbaren L-LDH von S.epidermidis

Im optischen Test (MM 23.2.) konnte die Rückreaktion (L-Laktat zu Pyruvat) bei den FDP-aktivierbaren L-LDHs nicht nachgewiesen werden. Auch in Gegenwart von Semicarbazidhydrochlorid, durch das Pyruvat aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird, war die Rückreaktion nicht meßbar. Damit war auch die Bestimmung der K_m -Werte für L-Laktat und NAD^+ nicht möglich.

Um jedoch eine gewisse Aussage über die Affinität dieser FDP-aktivierbaren L-LDH treffen zu können, wurde untersucht, inwieweit NAD^+ und L-Laktat in der Lage sind, die Pyruvatreduktion zu hemmen. Zu diesem Zweck wurden die in MM 23.1. angegebenen Endkonzentrationen von Pyruvat und NADH/H^+ entsprechend geändert.

a) Der Einfluß von L-Laktat auf die Pyruvatreduktion

Bei 0,2 mM Pyruvat (Endkonzentration in der Küvette) und in Gegenwart von 0,575 M L-Laktat - das entspricht einem Pyruvat:L-Laktat-Verhältnis von 1:2875 - konnte L-Laktat die Pyruvatreduktion nicht hemmen.

b) Der Einfluß von NAD^+ auf die Pyruvatreduktion

Bei 0,22 mM NADH/H^+ (Endkonzentration in der Küvette) und in Gegenwart von 34,5 mM NAD^+ - das entspricht einem $\text{NADH}/\text{H}^+:\text{NAD}^+$ -Verhältnis von 1:157 - war die Pyruvatreduktion zu 82 % gehemmt.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die FDP-aktivierbare L-LDH aus S. epidermidis eine sehr geringe Affinität zu L-Laktat besitzt. Vergleichsweise dazu ist die L-LDH von S. aureus ATCC 12600 bei einem Pyruvat : L-Laktat-Verhältnis von 1 : 200 zu 80 % gehemmt.

NAD⁺ hemmt die Pyruvatreduktion der FDP-aktivierbaren L-LDH. Allerdings scheint die Affinität zu NAD⁺ geringer zu sein als zu NADH/H⁺, da trotz eines Verhältnisses von 1 : 157 immerhin noch 18 % Restaktivität vorhanden sind.

12. Der Einfluß von anorganischem Phosphat auf die L-LDH-Aktivität

Der aktivierende Einfluß von anorganischem Phosphat wurde zuerst bei der ebenfalls FDP-aktivierbaren L-LDH von S. intermedius CCM 5739 gefunden und anschließend auch bei der S. epidermidis-L-LDH getestet (Abb. 25).

Beide FDP-aktivierbaren L-LDHs wurden in einer Konzentration von 1-1,5 M Phosphatpuffer nicht nur stabilisiert, sondern auch aktiviert. Es konnte bei 1,25 M Phosphatpuffer pH 6,2 in Abwesenheit von FDP die gleiche Aktivität erzielt werden, wie im Imidazolpuffer (s. Testansatz MM 23.1.) mit 0,57 mM FDP.

Es mußte rund 2200 mal mehr anorg. Phosphat als FDP zugegeben werden, um die gleiche aktivierende Wirkung zu erreichen. Diese hohe Phosphatkonzentration, die notwendig war, um die L-LDH zu aktivieren, erschien unphysiologisch. Trotzdem wurde der intrazelluläre Gehalt an freiem Phosphat getestet (s. Tab. 12). Er lag weit unter dem Niveau der erforderlichen Konzentration für eine Aktivierung der L-LDH.

Der erste Hinweis auf eine mögliche stabilisierende und aktivierende Wirkung von anorg. Phosphat, dem aber wenig Beachtung geschenkt wurde, tauchte bei der Reinigung der L-LDH

durch die Affinitätschromatographie auf. Hier wurde die L-LDH bei Verwendung von 0,5 M Phosphatpuffer an das Oxamatderivat gebunden, wogegen in Gegenwart anderer Salze wie NaCl oder NH_4Cl in der gleichen Konzentration, eine sofortige Desorption der L-LDH bewirkt wurde.

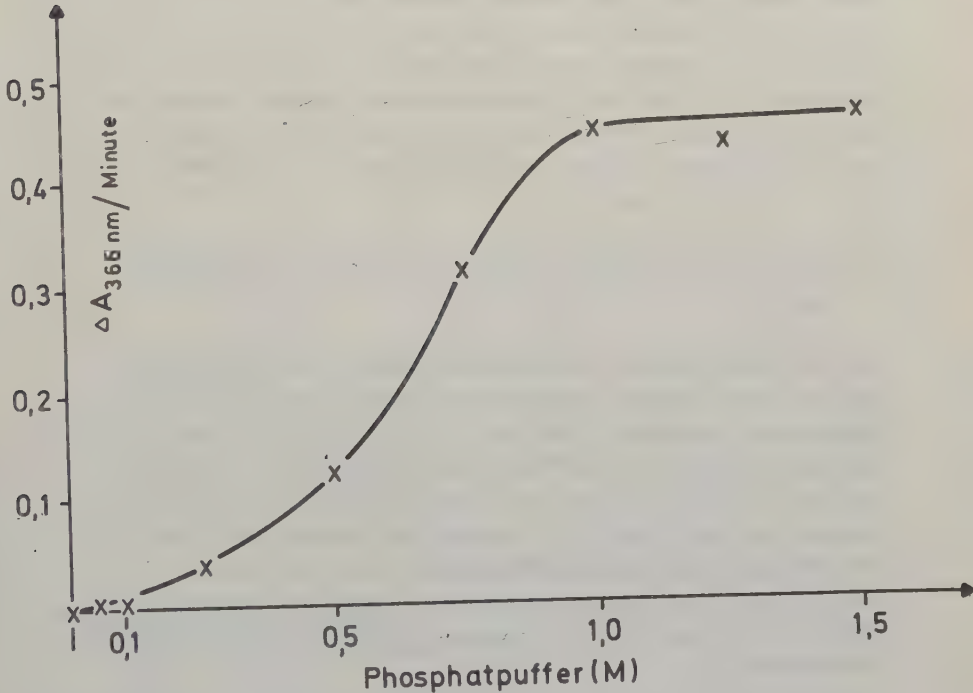


Abb. 25:

Einfluß von anorganischem Phosphat auf die Aktivierung der L-LDH.

Es wurde Phosphatpuffer in den angegebenen Konzentrationen als Testpuffer eingesetzt. FDP war im Testansatz nicht enthalten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 μg Protein (Ammoniumsulfatfällung, 50-70 %, dialysiert) gestartet.

Der Unterschied in der Aktivierung der LDH durch Phosphat bzw. FDP liegt in erster Linie in der Konzentration, die notwendig ist, um die gleiche katalytische Aktivität der L-LDH hervorzurufen. Dieser Unterschied macht deutlich, daß die Affinität der L-LDH zu FDP sehr viel höher ist (rund 2000 x) als zum freien Phosphat.

Die Tatsache, das Phosphat ebenfalls als Aktivator dienen kann, beweist, daß die Phosphatgruppe für die Bindung an das allosterische Zentrum der L-LDH wesentlich ist, obgleich in katalytischer Konzentration nur FDP wirksam ist (s. auch Abschnitt 6.2.).

13. Einfluß der Liganden auf die Hitzeinaktivierung der L-LDH

Die gereinigte L-LDH wurde in Gegenwart der in Tabelle 10 angegebenen Liganden (Endkonzentration 25 mM) einer Temperatur von 50°C ausgesetzt. Im Abstand der angegebenen Zeiten (Tab.10) wurde die Aktivität der LDH getestet und die prozentuale Aktivitätsabnahme, verglichen mit der Aktivität vor der Hitzebehandlung, in die Tabelle eingetragen. Es stellte sich bei diesem Versuch heraus, daß FDP und NADH/H^+ aber weit mehr noch FDP, NADH/H^+ und Pyruvat zusammen, die Hitzeinaktivierung verzögerten.

Tab.10: Einfluß der Liganden auf die Hitzeinaktivierung der L-LDH.

Inkubationszeit bei 50°C (Min.)	Abnahme der LDH-Aktivität (%)*						
	-	FDP**	FDP	FDP	-	-	-
	-	-	NADH/H ⁺	NADH/H ⁺	NADH/H ⁺	NADH/H ⁺	-
	-	-	-	Pyruvat	Pyruvat	-	Pyruvat
2	100	100	89	6	100	100	100
4			100	43			
8				71			
12				100			

* Die Enzymaktivität der Probe vor der Hitzebehandlung wurde jeweils mit 100 % festgesetzt.

** Die Ligandenkonzentration war so bemessen, daß die Endkonzentration der einzelnen Liganden ca. 25 mM war. Die Probleösungen waren in einem 50°C-Wasserbad gehalten. Zu den angegebenen Zeiten wurden 0,020 ml Proben entnommen und die Restaktivität sofort getestet (s. MM 23.1.)

III. Die FDP-aktivierbaren L-LDHs von Mikrokokken- und von S. intermedius-Stämmen.

14. Elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDHs von verschiedenen S. intermedius-Stämmen.

Bereits in den Abbildungen 5 und 6 wurde gezeigt, daß

- die L-LDHs von L1, P14, H47 und K6 (s.MM 1.) die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit aufweisen und
- sich in ihrer erhöhten elektrophoretischen Beweglichkeit deutlich von der S. epidermidis-LDH abgrenzen lassen.

Abbildung 26 zeigt, daß sich die L-LDHs der verschiedenen Stämme innerhalb der Art S. intermedius elektrophoretisch einheitlich verhalten. Bei allen der hier aufgeführten S. intermedius-Stämme ist die L-LDH FDP-aktivierbar. Diese Stämme besitzen keine NAD-abhängige D-LDH und produzieren aus Glucose ausschließlich L-Laktat, kein D-Laktat.

In der elektrophoretischen Beweglichkeit unterscheiden sie sich deutlich durch eine etwas höhere Wanderungsgeschwindigkeit von der S. epidermidis-L-LDH.

14.1. pH-Optimum

Bei einigen S. intermedius-Stämmen wurde das pH-Optimum der FDP-aktivierbaren L-LDH ermittelt. Es handelte sich dabei um die Stämme H4, CCM 5739 und L5. Für die H4- und CCM 5739-LDH ergab sich ein pH-Optimum von 5,0 und für die L5-L-LDH ein pH-Optimum von 5,5. Bei den L-LDHs von S. intermedius lag das pH-Optimum wie bei der S. epidermidis-L-LDH im sauren Bereich (Abb. 27).

14.2. Temperaturstabilität

Die FDP-aktivierbare L-LDH von S. intermedius CCM 5739 war gegenüber Hitzeeinwirkung generell unempfindlicher als die S. epidermidis-L-LDH. Durch Zugabe von FDP (Endkonzentration 36 mM) oder 1 M Phosphatpuffer (pH 6,3) konnte eine relativ hohe Hitzeresistenz erreicht werden (s. Abb. 28). FDP scheint etwas weniger hitzestabilisierend zu wirken als Phosphat. Dies rührt jedoch vermutlich daher, daß FDP bei diesen hohen Temperaturen bereits zerstört wird.

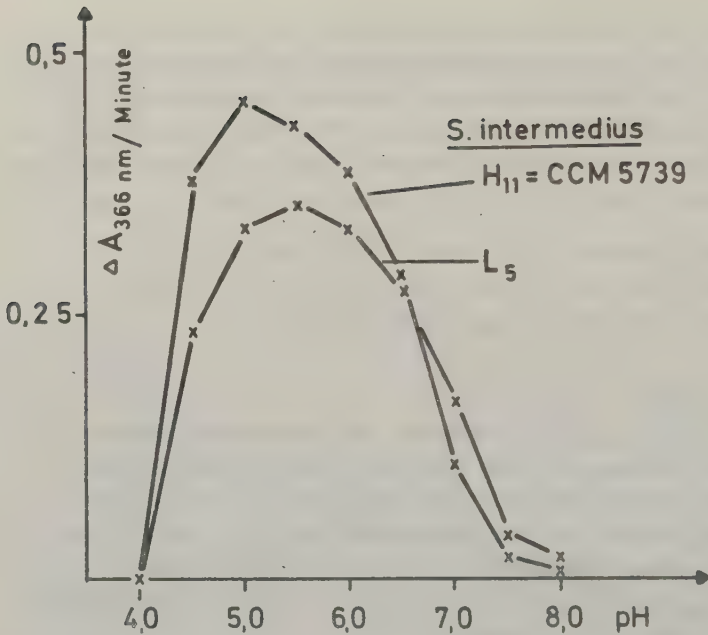


Abb. 27:

pH-Optimum der L-LDH von S. intermedius CCM 5739 und S. intermedius L5.

Der Aktivitätstest wurde - wie in MM 23.1. beschrieben - angesetzt. Statt Imidazolpuffer wurde hier lediglich der Citrat-Phosphat-Borat/HCl-Puffer (Universalpuffer) mit den angegebenen pH-Werten verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µg Protein einer dialysierten AS-Fällung (50-70 %) gestartet.

Die LDH-Aktivität vor der Hitzebehandlung war 100 %. Die Endkonzentration der einzelnen Liganden war 25 mM. Als Enzymlösung wurde dialysierte AS-Fällung (50-70 %) verwendet. Nach der Inkubationszeit in 66°C-Wasserbad wurde sofort die Aktivität getestet (s. MM 19.1.).

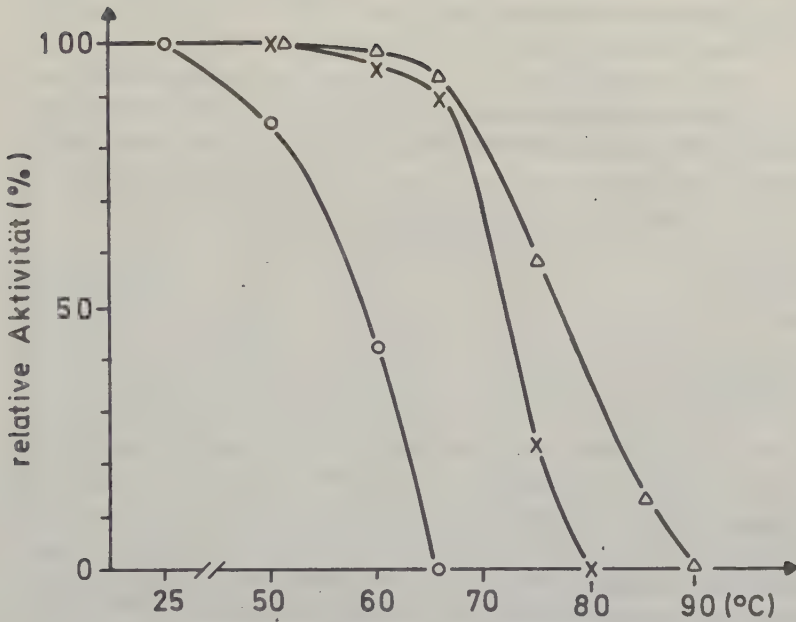


Abb. 28:

Einfluß von FDP und anorganischem Phosphat auf die Temperaturstabilität der L-LDH von S. intermedius CCM 5739.

Die LDH-Aktivität vor der Hitzebehandlung ist 100 %. Als Enzymlösung wurde dialysierte AS-Fällung (50-70 %) verwendet. Jede Probe wurde 4 Minuten lang erhitzt. Die FDP-Konzentration der Proben mit FDP betrug 36 mM, die Phosphatkonzentration 1 M.

Symbole: (o) ohne Phosphatverbindung,
(x) mit 36 mM FDP,
(Δ) mit 1 M Phosphatpuffer pH 6,3.

Tabelle 10 zeigt analog zu Tabelle 9 den Einfluß der Liganden auf die Hitzeinaktivierung.

Tab.11: Einfluß von Liganden auf die Hitzeinaktivierung der L-LDH von S. intermedius CCM 5739.

Inkubationszeit bei 66°C (Minuten)	Abnahme der LDH-Aktivität (%)				
	-	Pyruvat	-	-	Phosphat (1 M)
	-	-	NADH/H ⁺	-	
	-	-	-	FDP	
2	77	78	54	0	0
4	100	100	79	4	1
8			96	7	1

Die Anwesenheit von FDP und 1 M Phosphat führte zu einer deutlichen Hitzeresistenz der L-LDH. Aber auch NADH/H⁺ konnte die thermische Inaktivierung deutlich verzögern.

Nachträglich sei hier erwähnt, daß auch die S. epidermidis-L-LDH durch 1 M Phosphatpuffer erhöhte Hitzeresistenz aufwies.

15. Die FDP-aktivierbaren L-LDHs von M. kristinae ATCC 27570 und M. varians CCM 884.

In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" werden die Mikrokokken als obligat aerobe Bakterien beschrieben.

Im Oxidations-Fermentations-Test jedoch sind einige Stämme dabei, die eine Ausnahme bilden und Glucose unter anaeroben Bedingungen zu Säure abbauen. Zu diesen Ausnahmen gehören M. kristinae ATCC 27570 und M. varians CCM 884. Beide Stämme

besitzen eine FDP-aktivierbare L-LDH, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften nicht wesentlich von den anderen FDP-aktivierbaren L-LDHs unterscheidet (s.Tab.15).

Eine Untersuchung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der FDP-aktivierbaren L-LDHs aus diesen beiden Mikrokokkenstämmen ergab, daß sie gleich weit wandern wie die FDP-aktivierbaren L-LDHs aus S. intermedius-Stämmen (s.Abb.26). Wie in allen anderen Fällen wurde auch hier die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit durch Koelektrophorese abgesichert.

Im Gegensatz zu diesen fakultativ anaeroben Mikrokokken konnten wir bei den obligat aeroben Stämmen (z.B. M.luteus) keine LDH-Aktivität nachweisen. Das Unvermögen dieser Stämme, Glucose zu vergären, ist vermutlich auch auf den Verlust der LDH zurückzuführen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die FDP-aktivierbare L-LDH nicht durch Gene übertragen werden kann. Auf diese Weise könnte man sich die Fähigkeit zur Glucosevergärung bei einigen Mikrokokkenstämmen erklären. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß die Mikrokokken sich durch das GC-Verhältnis, die Zellwandzusammensetzung und andere Merkmale deutlich von den Staphylokokken unterscheiden (Schleifer und Kloos, 1975).

IV. Die physiologische Bedeutung der Regulation der L-LDH-Aktivität durch FDP bei Staphylokokken.

In den bisherigen Ausführungen wurden die FDP-aktivierbaren L-LDHs bei Staphylokokken auf ihre biochemischen Eigenschaften untersucht. Zu diesem Zweck wurden die LDHs aus ihrer natürlichen Umgebung, der Zelle, isoliert und anschließend gereinigt.

Solche Eingriffe können die Struktur, die Funktion und die Stabilität eines Enzyms stark verändern - man denke nur an die Effekte, die eine Dialyse bei der S. epidermidis-L-LDH hervorruft.

Die Frage war nun: welche Rolle spielt die 'in vitro' festgestellte FDP-Aktivierung der L-LDH 'in vivo', und worin besteht die physiologische Bedeutung dieser FDP-Regulation.

16. Der Einfluß der intrazellulären FDP-Konzentration auf die FDP-Aktivierbarkeit der L-LDH im zellfreien Extrakt.

Wie bereits unter Punkt 6.1 angedeutet, übt der Zeitpunkt der Zellernte einen gewissen Einfluß auf die FDP-Aktivierbarkeit der L-LDH aus:

Erntete man die Zellen noch in der log-Phase, so konnte die Aktivität der L-LDH von S. epidermidis im zellfreien Extrakt durch Zugabe von FDP nicht wesentlich gesteigert werden.

Erntete man die Zellen jedoch in der stationären Phase, so konnte die L-LDH-Aktivität im zellfreien Extrakt mit FDP um das 10-fache und mehr gesteigert werden.

Elektrophoretisch verhielten sich die L-LDHs aus den beiden Extrakten identisch. Durch Dialyse wurden die LDHs aus beiden Extrakten bezüglich ihrer Aktivität völlig FDP-abhängig.

Diese Ergebnisse schließen die Möglichkeit aus, daß in der log-Phase eine FDP-unabhängige und in der stationären Phase eine FDP-abhängige L-LDH synthetisiert wird.

Naheliegender ist die Vermutung, daß der intrazelluläre FDP-Pool in der stationären Phase aufgezehrt wird. Die L-LDH benötigt deshalb im zellfreien Extrakt exogenes FDP, um maximale Aktivität zu erreichen. Diese Annahme konnte

durch die Ergebnisse des folgenden Versuchs (s.Tab.12) bestätigt werden.

In 2 Parallelansätzen wurden jeweils 3 Staphylokokkenstämme untersucht:

S. aureus ATCC 12600

S. epidermidis ATCC 14990 und

S. intermedius CCM 5739

S. aureus ATCC 12600, der keine FDP-aktivierbare LDH besitzt, wurde lediglich zum Vergleich mit einbezogen.

Alle 3 Stämme wurden anaerob in HD-Bouillon mit verschiedener Glucosekonzentration angezogen. In einem Ansatz war die Glucosekonzentration (A) 5 mg/ml, im Parallel-Ansatz (B) 2,0 mg/ml. Bei (A) wurden die Zellen in der log-Phase und bei (B) in der stationären Phase geerntet. Zum Zeitpunkt der Ernte wurde der restliche Glucosegehalt des Mediums bestimmt und die intrazelluläre FDP-Konzentration der Zellen ermittelt. Die Bestimmung des intrazellulären FDP-Gehaltes erfolgte nach der unter MM 19.2. beschriebenen Membranfiltermethode. Im Anschluß daran wurden die Zellen abzentrifugiert und der zellfreie Extrakt gewonnen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß bei allen 3 Stämmen gleiche Bedingungen eingehalten wurden. Der zellfreie Extrakt wurde auf LDH-Aktivität und auf Aktivierbarkeit der LDH durch FDP untersucht.

Wie aus Tab.12 A hervorgeht, ist die Glucose in der log-Phase noch nicht völlig verbraucht und es ist ein meßbarer FDP-Pool nachweisbar. Im zellfreien Extrakt konnte bisher jedoch kein FDP nachgewiesen werden, da der FDP-Pool durch die darin enthaltenen Enzyme sofort abgebaut wird. Das an die L-LDH gebundene FDP liegt in seiner Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze.

Tab.12: Der Einfluß von Glucose auf die intrazelluläre FDP-Konzentration und auf die FDP-Aktivierbarkeit der L-LDH im zellfreien Extrakt.

	Wachstumsphase	Stämme	pH	Rest-glucose im Medium (mg/ml)	FDP-Pool (nMol/mg Protein)	anorg. Phosphat (nMol/mg Protein)	spez. Akt. der LDH mit FDP (s. MM 25.1.)	spez. Akt. ohne FDP	Aktivierungsfaktor von FDP
A	Logarithm. Phase	<u>S. aureus</u> ATCC 12600	5,6	1,9	42,0	37,0	49,0	49,0	0
		<u>S. epidermidis</u> ATCC 14990	6,2	2,8	89,5	95,4	14,2	14,2	0
		<u>S. intermedium</u> CCM 5739	6,1	2,7	77,9	51,3	20,8	11,5	1,8
B	Stationäre Phase	<u>S. aureus</u> ATCC 12600	5,8	0	0	32,0	54,5	54,5	0
		<u>S. epidermidis</u> ATCC 14990	5,9	0,04	0	55,7	19,1	2,0	9,4
		<u>S. intermedium</u> CCM 5739	5,8	0,02	0	34,8	38,4	2,7	14,2

A) Anzucht der Zellen anaerob in HD-Medium mit einer Glucosekonzentration von 5 mg/ml.

B) Anzucht der Zellen anaerob in HD-Medium mit einer Glucosekonzentration von 2,0 mg/ml.

In Versuch 12 B wurden die Zellen in der stationären Phase geerntet. Gleichzeitig wurde hier weniger Glucose angeboten, um

- a) den Zeitpunkt des Glucoseverbrauches schneller zu erreichen und
- b) den pH-Wert des Mediums nicht ungleich tiefer sinken zu lassen als in Versuch A.

Die Glucose im Nährmedium war hier gänzlich aufgebraucht und es konnte auch kein meßbarer FDP-Pool nachgewiesen werden. Die spezifischen Aktivitäten der LDHs (mit FDP im Testansatz) liegen bei A und B in einer vergleichbaren Größenordnung. Die LDH-Aktivität konnte jedoch in Versuch B durch Zugabe von FDP im Testansatz bei S. epidermidis um das 9,4-fache und bei S. intermedius um das 14,2-fache gesteigert werden. Daraus kann man schließen, daß durch das intrazelluläre Defizit an FDP auch die LDH-Aktivität zurückgeht.

Bei dem S. aureus-Stamm, der keine FDP-aktivierbare LDH besitzt, konnte die LDH-Aktivität durch FDP erwartungsgemäß nicht beeinflußt werden.

Weiterhin geht aus der unterschiedlichen Aktivierbarkeit der L-LDHs hervor, daß FDP eine sehr lockere Bindung mit der LDH eingehen muß. Diese Tatsache wird auch von den in Tab. 7 dargestellten Befunden unterstützt.

17. Der Abbau von Glucose unter anaeroben und aeroben Bedingungen durch eine gewaschene, nicht wachsende Zellsuspension von S. epidermidis ATCC 14990.

Im vorangegangenen Versuch konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der LDH im zellfreien Extrakt von der intrazellulären

FDP-Konzentration abhängig ist. Hier soll nun untersucht werden, ob

- a) die intrazelluläre FDP-Konzentration durch anaerobe bzw. aerobe Bedingungen beeinflusst wird,
- b) ob dadurch auch die L-LDH-Aktivität, diesmal gemessen an der Produktion von L-Laktat, reguliert wird,
- c) ob Oxamat, als Inhibitor der L-LDH, einen Einfluß auf die L-Laktat-Produktion und auf den FDP-Pool ausübt,
- d) welche Gärprodukte aus Glycerin gebildet werden.

Zur Durchführung des Versuches wurden Zellen von S.epidermidis ATCC 14990 unter heftigem Schütteln in HD-Medium, das nur 0,2 % Glucose enthielt, angezogen. Zum Zeitpunkt des Erntens war die gesamte Glucose verbraucht. Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und anschließend in diesem Phosphatpuffer aufgenommen. Die optische Dichte (578 nm) dieser Zellsuspension betrug 86,6, das Trockengewicht (TG) der Zellen betrug 22,7 mg/ml.

Diese Zellsuspension wurde mit Chloramphenicol versetzt (25 µg/ml) und dann in 4 Teile zu je 10 ml aufgeteilt. Chloramphenicol diente zur Hemmung der noch in geringem Umfang stattfindenden Proteinsynthese. Nachdem die Zellsuspensionen 30 Minuten mit O₂ bzw. N₂ begast wurden, wurde die Kohlenstoffquelle zugegeben. Die Endkonzentration von Glucose betrug 5 µMol/ml, von Oxamat 25 µMol/ml und von Glycerin 44 µMol/ml Zellsuspension. Zu den in Tabelle 13 angegebenen Zeitpunkten wurden von den 3 Ansätzen jeweils 0,5 ml Probe entnommen und mit 0,1 ml kalter, 35 %iger Perchlorsäure behandelt. Nach der Neutralisation dieser Proben wurden der Triosephosphat (TP)- und der FDP-Gehalt ermittelt (s.14.1.).

Tab.13: Intrazelluläre FDP-Konzentration in Zellen von *S.epidermidis* ATCC 14990 während des Abbaus von Glucose und Glycerin in gepufferter Zellsuspension unter anaeroben und aeroben Bedingungen.

	aerob				anaerob			
Kohlenstoff- quelle: (End- konzentration)	Glucose (5 µMol/ml)	Glycerin (44 µMol/ ml)			Glucose (5 µMol/ ml)	Oxamat (25 µMol/ml)	Glucose (5 µMol/ml)	
nMol/mg TG								
Probeentnahme nach Zugabe der C-Quelle (Minuten)	TP*	FDP	TP	FDP	TP	FDP	TP	FDP
0	o	o	o	o	o	o	o	o
5	o	o	o	o	7,5	6,6	1,1	2,6
10	o	o	o	o	7,0	15,4	2,9	2,8
20	o	o	o	o	7,5	30,0	4,6	5,7
40	o	o	o	o	16,2	37,8	7,0	19,1
60	o	o	o	o	17,6	42,3	4,6	27,7

Nach 60 Minuten wurden die Zellen abzentrifugiert. Vom Überstand wurden

- der pH-Wert und
- die Konzentration verschiedener Gärprodukte untersucht

pH	6,7		6,0		6,6		6,8	
nMol/mg TG								
D- und L- Laktat	D	L	D	L	D	L	D	L
	o	3,5	o	o	o	776,1	o	270,0
Acetat	154,0		233,0		44,0		57,0	
Äthanol	o		o		o		o	
Formiat	o		o		o		o	
Acetoin**	++		++		+		(+)	

Nach 60 Minuten wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand auf den Gehalt an Laktat, Acetat, Äthanol, Formiat und Acetoin untersucht. Als Ergebnis dieses Versuches können folgende Punkte festgehalten werden:

1. Nur unter anaeroben Bedingungen ist ein meßbarer FDP-Pool nachzuweisen. Der FDP-Pool nimmt kontinuierlich zu, bis er ein Plateau erreicht. Er nimmt erst wieder ab, wie aus anderen Versuchen hervorgeht, wenn der Glucosegehalt im Medium annähernd verbraucht ist.
2. Die Konzentration des ausgeschiedenen L-Laktats ist unter anaeroben Bedingungen über 200 mal höher als unter aeroben.
3. Bei der aeroben Verwertung von Glucose und Glycerin dominiert Essigsäure über Laktat, während beim anaeroben Glucoseabbau (ohne Oxamat) 20 mal mehr Laktat gebildet wird als Acetat.
4. Auch Acetoin wird unter aeroben Bedingungen in höherer Konzentration ausgeschieden als unter anaeroben.
5. In Gegenwart von Oxamat ist der Anstieg des FDP-Pools verlangsamt, verglichen mit dem Wert, der in Abwesenheit von Oxamat gefunden wurde. Dabei werden 74 % weniger L-Laktat gebildet.
6. Diese Versuche wurden wiederholt auch in Abwesenheit von Chloramphenicol, welches keinen offensichtlichen Einfluß auf die Verteilung der Endprodukte ausübte.

Erklärung zu Tab.13:

- * TP = Triosephosphat (Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehydphosphat)
- ** Acetoin wurde mittels Voges-Proskauer-Reaktion nachgewiesen. Eine quantitative Aussage ist daher nicht möglich:
++ = stark positiv, + = positiv, (+) = mäßig positiv

D. DISKUSSION

Die elektrophoretische Beweglichkeit der NAD-abhängigen LDHs innerhalb der Gattung Staphylococcus

Staphylokokken bauen Glucose unter anaeroben Bedingungen überwiegend zu Laktat ab. Nach ihrer Fähigkeit, aus Glucose entweder D-Laktat, L-Laktat oder beide Laktatisomere zu bilden, wurden die einzelnen Staphylokokkenarten in Tab.2 in Gruppen eingeteilt.

Eine weitere Differenzierung der Staphylokokkenarten innerhalb dieser Gruppen ergibt sich durch die charakteristische elektrophoretische Beweglichkeit der NAD-abhängigen, stereospezifischen D- und L-LDHs. So lassen sich die beiden Arten S. aureus und S. warneri, die beide ein annähernd racemisches Gemisch aus D- und L-Laktat bilden, durch die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit ihrer D- und L-LDH gut unterscheiden (s. Abb. 2 und 3).

Aufgrund einer Reihe von gelelektrophoretischen Untersuchungen haben sich bisher bei den Staphylokokken 3 L-LDH-Typen und 2 D-LDH-Typen herauskristallisiert. Diese LDH-Typen unterscheiden sich deutlich in ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und treten bei den verschiedenen Arten - wenn gleich in unterschiedlicher Zusammenstellung - immer wieder auf.

Die drei L-LDH-Typen und ihr Vorkommen:

- a) Die kurzwandernde L-LDH aus S. aureus ATCC 12600 und CCM 2570.

Eine gleiche oder nur geringfügig abweichende Wanderungsgeschwindigkeit weisen die L-LDHs aus S. saprophyticus

CCM 883, S.simulans ATCC 27848 und S.xylosus DSM 20267 auf.

- b) Die FDP-aktivierbare L-LDH-Bande von S.epidermidis ATCC 14990.

Von den 2 L-LDH-Banden aus S.warneri besitzt die weiter wandernde Bande die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie die L-LDH-Bande von S.epidermidis.

- c) Die FDP-aktivierbare L-LDH von S.intermedius.

Diese L-LDH weist die größte Wanderungsgeschwindigkeit auf und stellt für diese Art ein charakteristisches Merkmal dar.

Für die D-LDHs ergeben sich folgende zwei Typen :

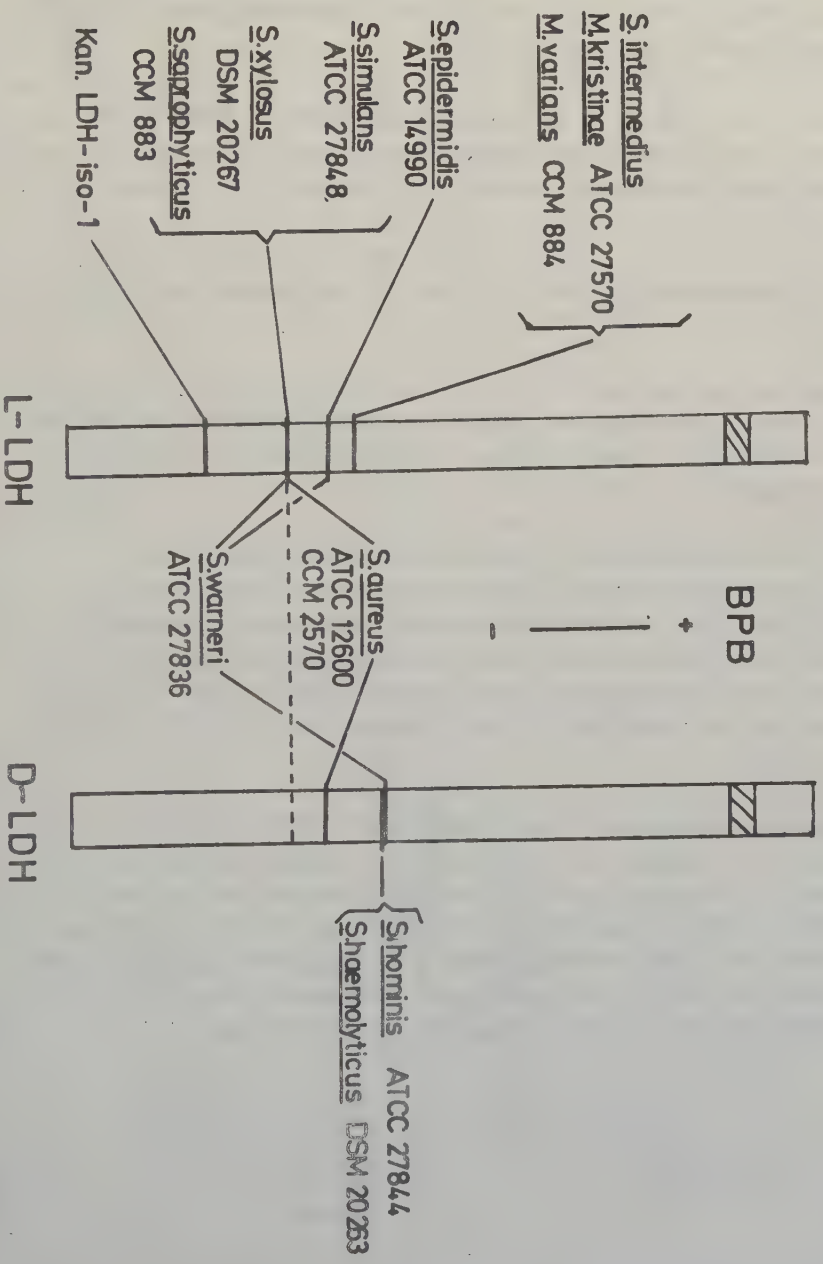
- a) Die D-LDH aus den S.aureus-Stämmen und

- b) die D-LDHs von S.hominis ATCC 27844, S.haemolyticus DSM 20263 und S.warneri ATCC 27836.

Abbildung 29 zeigt einen Überblick über die elektrophoretische Beweglichkeit der NAD-abhängigen D- und L-LDHs bei Staphylokokken. Das Diagramm ist so eingeteilt, daß links die L-Laktat-, in der Mitte die D/L-Laktat- und rechts die D-Laktat-Bildner aufgeführt sind.

Abbildung 29:

Übersicht über die elektrophoretische Beweglichkeit von D- und L-LDHs bei Staphylokokken.



Biochemisch-physikalische Merkmale der NAD-abhängigen D-LDHs bei Staphylokokken (s.Tab.14)

Bei allen bisher untersuchten D-LDHs bei Staphylokokken wurde stets ein Molekulargewicht von rund 70 000 Daltons gefunden. Dies entspricht etwa der Hälfte des Molekulargewichts, das für die L-LDHs ermittelt wurde.

Das pH-Optimum der D-LDHs liegt im sauren Bereich, zwischen 4,5 und 5,0.

Während zum sauren Bereich hin die pH-Optimumkurve schnell absinkt, erstreckt sie sich weit in den alkalischen Bereich. So ist z.B. bei pH 9,0 noch 30-50 % der D-LDH-Aktivität vorhanden (s. Götz, 1973 und Lehmer, 1975).

In ihrem kinetischen Verhalten gegenüber Substrat und Cosubstrat sind keine wesentlichen Unterschiede bei den in Tabelle 14 aufgeführten D-LDHs zu erkennen. Generell kann man sagen, daß die Affinität zu Pyruvat (der K_m variiert zwischen 0,35 und 1,25 mM) rund 20 bis 50 mal höher ist als zu D-Laktat (K_m -Werte bewegen sich zwischen 17 und 33 mM).

Der Reaktionsablauf kann durch Zugabe des einen oder anderen Substrats gehemmt werden. Durch Zugabe von D-Laktat wird die Pyruvatreduktion und durch Zugabe von Pyruvat die D-Laktat-Oxidation gehemmt. $NADH/H^+$ und NAD^+ , die sich in ihrer Affinität zur D-LDH aus S. aureus nicht unterscheiden, wirken ebenfalls antagonistisch. D/L-Malat oder D/L-Tartrat haben keinen Einfluß auf die Pyruvatreduktion.

Tab.14: Vergleich einiger kinetischer und physikalischer Eigenschaften von NAD-abhängigen D-(-)-Laktatdehydrogenasen.

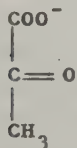
	<u>S. hominis*</u> ATCC 27844	<u>S. haemolyticus*</u> DSM 20263	<u>S. warneri*</u> ATCC 27863	<u>S. aureus</u> ATCC 12600
MG (mit SDZ bestimmt)	69000	72 000	73000	68000
pH-Optimum	4,5 - 5,0	4,5	4,5	5,0
<u>K_m (mM) für:</u>				
Pyruvat	0,90	1,25	0,5	0,35
NADH/H ⁺	0,20	0,18	0,11	0,80
D-Laktat	33,0	25,0	17,0	17,0
NAD ⁺	nu**	nu**	nu**	0,80
<u>Hemmung der D-LDH-Aktivität(%):</u>				
a) durch Oxamat	keine	keine	keine	keine
b) durch ATP (Endkonz. 1,25 mM)	15	7,5	0	12
c) durch Hitzebehandlung bei 50°C, 6 Minuten	55	90	94	96
Hitzeresistenz mit:				
- NADH/H ⁺	-	-	+	-
- NADH/H ⁺ + Pyruvat	++	+	-	+
<u>Substratspezifität: Oxidation von NADH/H⁺ (%) :</u>				
a) mit Pyruvat = 100 %	100	100	100	100
b) Oxalacetat	25	29	20	nu**
c) α-Ketobutyrat	12	12	26	nu**

* Zum Vergleich die Ergebnisse von A. Lehmer (1975)
 ** nu = nicht untersucht

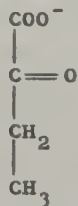
Die D-LDHs werden im Gegensatz zu den L-LDHs durch Oxamat nicht in ihrer Aktivität gehemmt. Daraus kann man schließen, daß die Methylgruppe für die Erkennungs- und Bindungsregion essentiell ist und nicht durch eine basische Aminogruppe ersetzt werden kann. ATP dagegen wirkt, mit Ausnahme der D-LDH aus S.warneri, als Inhibitor.

Alle D-LDHs sind relativ hitzeempfindlich. Die Gegenwart von NADH/H^+ bzw. NADH/H^+ und Pyruvat bewirkt jedoch eine gewisse Hitzeresistenz.

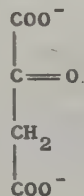
Die Substratspezifität der D-LDHs ist nicht besonders ausgeprägt. So kann neben Pyruvat auch mit Oxalacetat und α -Ketobutyrat NADH/H^+ reduziert werden. Verglichen zur Aktivität mit Pyruvat liegt bei diesen Substraten die Aktivität zwischen 12 und 30 %.



Pyruvat



α -Ketobutyrat



Oxalacetat

Vergleich der NAD-abhängigen L-LDH von S.aureus ATCC 12600 mit den FDP-aktivierbaren L-LDHs (s.Tab.15)

Das Molekulargewicht bei den L-LDH-Typen liegt zwischen 120 000 und 130 000 Daltons.

Während das pH-Optimum der L-LDH aus S.aureus bei 7,5 liegt, bewegt sich das pH-Optimum der FDP-aktivierbaren L-LDHs zwischen 5,0 und 5,5. Im alkalischen Bereich bei pH 7,5 - 8,0

sind die FDP-aktivierbaren L-LDHs annähernd inaktiv (s. Abb. 13 und 27). Dadurch unterscheiden sie sich deutlich von der S. aureus-L-LDH, die auch bei pH 9,0 noch rund 40 % ihrer optimalen Aktivität aufweist.

Die FDP-aktivierbaren L-LDHs lassen sich im Gegensatz zur S. aureus-L-LDH durch FDP und hohe Phosphatkonzentrationen aktivieren und stabilisieren.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist das Unvermögen der FDP-aktivierbaren L-LDHs, im optischen Test die Rückreaktion (Laktatoxidation) zu katalysieren.

Da die Rückreaktion im alkalischen Bereich begünstigt wird, verwendet man bei den nicht FDP-aktivierbaren LDHs Glycin-Hydrazin-Puffer (pH 9,0). Durch Hydrazin wird Pyruvat aus dem Gleichgewicht der Reaktion entfernt. In diesem pH-Bereich sind jedoch die FDP-aktivierbaren L-LDHs völlig inaktiv. Aber auch bei niedrigeren pH-Werten (pH 7,5 und 6,5) und der Verwendung von Semicarbazid, konnte keine oder nur minimale Aktivität im optischen Test (s. MM 23.2.) nachgewiesen werden. Es ist daher unwahrscheinlich, daß die FDP-aktivierbaren L-LDHs auch unter physiologischen Bedingungen zur Rückreaktion befähigt sind.

Neben den hier genannten Unterschieden ist die Aktivierung der S. epidermidis-L-LDH durch FDP am augenscheinlichsten. Man bezeichnet diese Art der Aktivierung als Vorstufenaktivierung, welche der Endprodukthemmung gegenüberzustellen ist. Bei der Vorstufenaktivierung dient der erste Metabolit einer Reaktionsfolge als Aktivator für das letzte Enzym dieser Reaktionsfolge.

Tab.15: Vergleich einiger kinetischer und physikalischer Eigenschaften von NAD-abhängigen L-(+)-Laktatdehydrogenasen

A		H				
nicht FDP-aktivierbare L-LDH		FDP-aktivierbare L-LDHs				
	<u>S. aureus</u> ATCC 12600	<u>S. epidermidis</u> ATCC 14990	<u>S. inter-</u> <u>medius</u> 5739 (H11)	<u>S. inter-</u> <u>medius</u> H47	<u>M. kristinae</u> ATCC 27570	<u>M. varians</u> CCM 884
MG (mit SDZ bestimmt)	125 000	130 000	130 000	122 000	120 000	121 000
pH-Optimum	7,5	5,5	5,0	5,5	5,5	5,5
K_m oder $(M)_{0,5v}$ (mM) für:						
Pyruvat	0,9	1,0	0,7	1,0	0,8	0,2
NADH/H ⁺	0,7	0,05	0,1	0,07	0,09	0,06
L-Laktat	45,0	.	.	.	.	.
NAD ⁺	0,8	.	.	.	.	.
FDP	0	0,15	0,1	0,6	0,01	0,09
Aktivierung der L-LDH durch hohe (PO_4^{3-})	-	+	+	+	+	+
Deutliche Erhöhung der Temperaturstabilität durch FDP und Phosphat	-	+	+	+	+	+
Hemmung durch Oxamat, ADP und ATP	+	+	+	+	+	+

* Bei den FDP-aktivierbaren LDHs war die Rückreaktion (von L-Laktat zu Pyruvat) nicht nachweisbar.

In allen bisher bekannten Beispielen der Vorstufenaktivierung katalysiert das aktivierte Enzym eine Reaktion, welche unter physiologischen Bedingungen praktisch irreversibel ist (Sanwal, 1970). Wie wir oben gesehen haben, macht die FDP-aktivierbare L-LDH in dieser Hinsicht keine Ausnahme.

Die allosterische Kontrolle der FDP-aktivierbaren L-LDH

FDP ist ein allosterischer Effektor der L-LDH, die spezifische Bindungsstellen für FDP besitzt. Diese Bindungsstellen sind von den aktiven Zentren für Pyruvat und NADH/H^+ räumlich getrennt. Wäre auch nur eine Bindungsstelle identisch, würde sich dies sofort in Form einer kompetitiven Hemmung bemerkbar machen. Im allgemeinen kann man davon ausgehen, daß das Enzym durch die Bindung eines Effektors eine etwas andere Konformation annimmt, wodurch die Aktivität des Enzyms beeinflußt wird. Über den Mechanismus der Konformationsänderung gibt es verschiedene Modellvorstellungen:

Das Monod-Wyman-Changeux-Modell (MWC-Modell) geht davon aus, daß das Enzym aus mehreren Untereinheiten besteht und in mindestens zwei verschiedenen Konformationen vorliegt, die

als T-Zustand (tense) und R-Zustand (relaxed) bezeichnet werden. Durch die Bindung des Effektors kann das Enzym entweder in dem inaktiven T-Zustand bleiben (Inhibitor) oder in den aktiven R-Zustand (Aktivator) übergeführt werden. Mischzustände (Hybridformen) sind bei diesem Modell ausgeschlossen, da alle Konformationsänderungen simultan erfolgen.

Im Gegensatz dazu, werden im Sequential-Modell von Koshland, Nemethy und Film (1966) auch bei den Untereinheiten - unabhängig voneinander - Konformationsänderungen postuliert. Dabei induziert die Bindung des Effektors die Konformationsänderung einer Untereinheit und diese Konformationsänderung beeinflusst auch die benachbarten Untereinheiten.

Schließlich sei noch das sogenannte "slow transition"-Modell von Ainslie, Shill und Neet (1972) erwähnt. Dieses Modell erklärt Abweichungen von der Michaelis-Menten-Kinetik auch bei monomeren Enzymen. Es postuliert eine langsame Umwandlung der Konformation des Enzyms von E zu E', welche vom Substrat beeinflusst wird.

Der genaue Mechanismus von kooperativen Effekten ist noch für kein Enzym bekannt.

Im Folgenden soll nun ein sehr vereinfachtes Modell für die FDP-aktivierbare L-LDH vorgeschlagen werden. Eine Anlehnung an die bisher bekannten Modelle ist schwierig, da sowohl das MWC- als auch das Sequential-Modell von einem stabilen, polymeren Protein ausgehen. Wie aber die Untersuchungen gezeigt haben, ist die FDP-aktivierbare L-LDH nicht stabil, sondern dissoziiert sehr leicht in ihre Untereinheiten.

Diesem Modell liegen folgende Ergebnisse und Erkenntnisse zugrunde:

1. FDP bewirkt eine positive Kooperativität, wofür folgende Ergebnisse sprechen:
 - a) der sigmoide Kurvenverlauf bei der FDP-Sättigungskurve (s.Abb. 2o A),
 - b) der aufwärtsgebogene Kurvenverlauf bei der Lineweaver-Burk-Auftragung (s.Abb. 2o B),
 - c) der Hillkoeffizient von 3,9.
2. Der Hillkoeffizient von 3,9 besagt weiterhin, daß die LDH mindestens 4 Bindungsstellen für FDP besitzt.
3. Die LDH ist in Abwesenheit von FDP (nach Dialyse) in Untereinheiten dissoziiert (s.Abb.17).
4. Die Zugabe von FDP und NADH/H^+ bewirkt eine Reassoziierung der Untereinheiten zum aktiven Tetramer (s.Abb.16).
5. Die Zeit-Umsatz-Kurve (Abb.21) zeigt, daß ein langsamer Reaktionsschritt vorliegen muß, da erst 4 Minuten nach Zugabe von FDP die "steady state"-Phase erreicht wird.
6. Die Eliminierung dieser Anlaufphase durch Vorinkubation der LDH mit FDP besagt, daß der langsame Reaktionsschritt entweder in der Bindung von FDP an die LDH-Untereinheiten oder in der Aggregation dieser FDP-Untereinheiten zu einem aktiven Oligomer (Dimer oder Tetramer) besteht.

Aufgrund der zuletzt genannten Punkte gehen wir von der Annahme aus, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während des Aktivierungsprozesses der L-LDH durch FDP erfolgt. Mögliche Einflüsse durch Pyruvat oder NADH/H^+ auf den Aktivierungsprozeß können in diesem Modell nicht berücksichtigt werden.

Da anzunehmen ist, daß die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten im nachfolgenden Modell (Abb.30) unterschiedliche Werte besitzen, ergeben sich drei Möglichkeiten für den langsamen und damit geschwindigkeitsbestimmenden Schritt:

$$1. \quad k_1' \ll k_2 \ll k_3$$

$$2. \quad k_1 \approx k_2 \ll k_3$$

$$3. \quad k_1 \ll k_2 \approx k_3$$

zu 1. Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit erhöht sich stufenweise von $A \longrightarrow C$.

zu 2. Die Reaktionen A und B erfolgen langsam, Reaktion C sehr schnell.

zu 3. Lediglich Reaktion A ist langsam, die Reaktionen B und C erfolgen schnell.

Das Vorliegen der positiven Kooperativität hat notwendigerweise zur Folge, daß die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit - ausgedrückt durch die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 und k_3 - von langsam $\longrightarrow$ schnell fortschreiten muß und nicht umgekehrt; denn positive Kooperativität heißt, daß die Bindung eines FDP-Moleküls die Bindung des nächsten erleichtert. Der langsame und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt kann entweder Reaktion A, oder B, oder beide Reaktionen zusammen - aber nicht Reaktion C sein. Der Übergang der Reaktionsgeschwindigkeit von langsam zu schnell erklärt nicht nur die Sigmoidität der FDP-Sättigungskurve - mit den sich daraus ergebenden typischen Kurvenverläufen im Lineweaver-Burk-Diagramm und dem Hill-Diagramm - sondern auch die Anlaufphase bei der Zeit-Umsatz-Kurve, bei der zeitabhängig (in der Größenordnung von Minuten) eine Zunahme der Beschleunigung in der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgt.

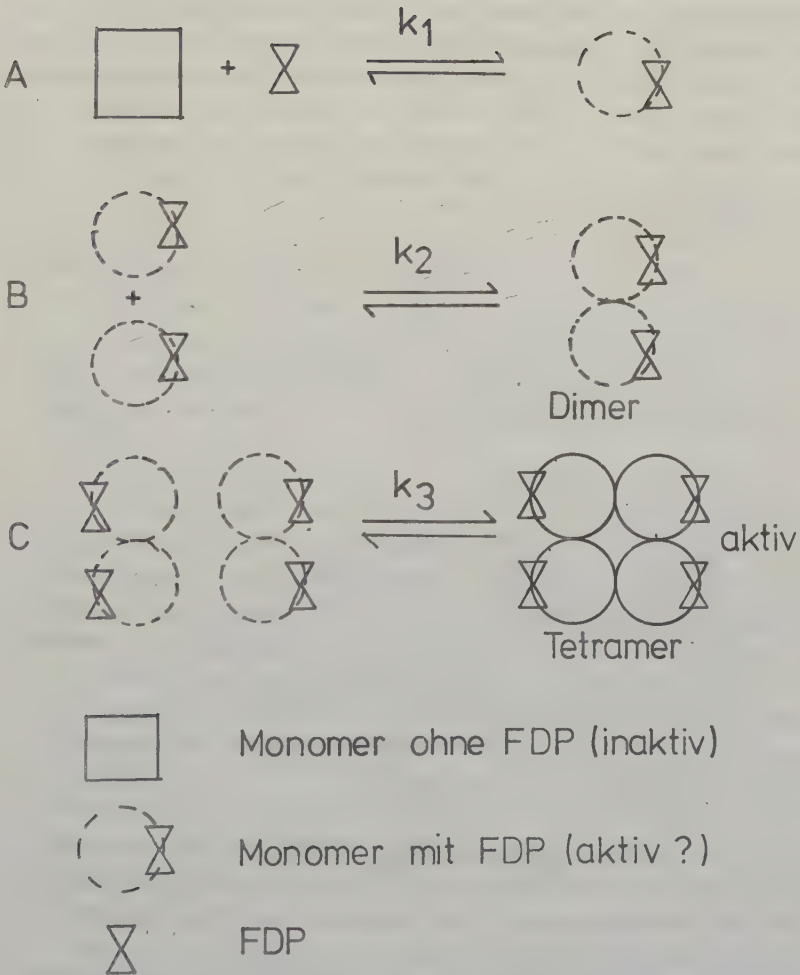


Abb. 30:

Möglicher Reaktionsablauf bei der FDP-Aktivierung der L-LDH.

Aufgrund dieses Modells hat jede Untereinheit eine Bindungsstelle für FDP. Die Bindung von FDP bewirkt eine Konformationsänderung, die die Bereitschaft zur Aggregation mit einer anderen Untereinheit erhöht. Die dadurch entstehenden Dimere aggregieren schließlich zum aktiven Tetramer, wobei dieser letzte Schritt sehr schnell erfolgen muß, wie oben bereits ausgeführt. Die gestrichelten Kreise sollen andeuten, daß unbekannt ist, ob das Monomer oder das Dimer bereits Aktivität aufweist.

Einige Arbeiten, die sich mit dieser Frage beschäftigen, ob LDH-Monomere aktiv sind, kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Cho und Swaisgood (1974) fanden, daß das LDH-Monomer aus Kaninchenmuskel aktiv ist. Die Autoren haben dabei die LDH-Untereinheit kovalent an Glasperlen gebunden.

Chan und Mosbach (1976) kamen zum gegenteiligen Ergebnis. Sie haben das Monomer der Kaninchenmuskel-LDH einmal kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose und zum anderen über Disulfid-Brücken an Sepharose (LDH-S-S-Sepharose) gebunden. In beiden Fällen konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Zu erwähnen sei noch, daß von der Kaninchenmuskel-LDH bekannt ist, daß die vorhandenen reaktiven Sulfhydrylgruppen nicht notwendig sind für die katalytische Aktivität. Auch die ebenfalls an Sepharose gebundene Untereinheit der Hundshai-Muskel-LDH war inaktiv (Levi, 1975).

Eine weitere Arbeitshypothese, die aber noch mehr von den bisher bekannten Modellen abweicht, ist folgende: FDP mit den beiden Phosphatgruppen ist eine bipolare Verbindung, die sich besonders gut als Bindeglied zwischen den L-LDH-Untereinheiten eignen würde. Dann hätte allerdings jede L-LDH-Untereinheit nicht nur eine, sondern zwei Bindungsstellen für die Phosphatgruppe des FDP. FDP würde somit als Brückenglied oder "Spacer" zwischen den 4 Untereinheiten dienen.

Den bisherigen Ausführungen liegen fast ausschließlich Ergebnisse mit isolierter und gereinigter LDH zugrunde. In diesem Abschnitt soll nun aufgrund von 'in vivo'-Versuchen die Regulation und die physiologische Bedeutung der FDP-aktivierbaren L-LDH untersucht werden.

Der FDP-Pool

Die in Tab. 12 dargestellten Ergebnisse sollen darüber Aufschluß geben, ob Glucose im Nährmedium den FDP-Pool und die Aktivierbarkeit der L-LDH beeinflusst. Anlaß zu dieser Untersuchung war die frühe Beobachtung, daß beim Aktivitätstest in verschiedenen zellfreien Extrakten die L-LDH von S.epidermidis unterschiedlich stark FDP-aktivierbar war. Eine Erklärung dieses Phänomens brachte nun dieser Versuch.

Die Anwesenheit einer genügend hohen Glucosekonzentration im Medium (s.Tab.12 A) bewirkte, daß bei den Stämmen S.epidermidis und S.intermedius ein FDP-Pool aufgebaut wurde. Dieser hat wiederum zur Folge, daß der Überschuß an FDP zur vollen Absättigung der FDP-aktivierbaren L-LDHs führt, deren Aktivität dann im zellfreien Extrakt durch exogenes FDP nicht oder kaum mehr gesteigert werden kann. Wenn jedoch das Medium an Glucose verarmt ist (s.Tab.12 B), erschöpft sich auch der FDP-Pool. Dies hat bei den Stämmen mit FDP-aktivierbarer L-LDH zur Folge, daß die L-LDH-Aktivität stark sinkt. Durch Zugabe von exogenem FDP kann die Reaktionsgeschwindigkeit der L-LDH um das 9- bzw. 14-fache gesteigert werden.

Wurden die Zellen also in der stationären Phase geerntet, wenn Glucose fast verbraucht war, dann war der Aktivierungsfaktor hoch. Wurden die Zellen dagegen in der exponentiellen

Phase geerntet, mit noch ausreichendem Glucosegehalt im Wachstumsmedium, dann war der Aktivierungsfaktor der L-LDH niedrig.

Die Entstehung des FDP-Pools wird offensichtlich durch Enzyme hervorgerufen, die den Durchfluß der Glycolyse blockieren. Dabei kann diese Blockade durch FDP aufgehoben werden. Solche Enzyme können z.B. FDP-aktivierbare Pyruvat-Kinase, oder aber wie in unserem Fall die FDP-aktivierbare L-LDH sein. Die FDP-aktivierbare L-LDH fungiert dabei als ein Rückkopplungssystem, das die Anhäufung seines eigenen Aktivators in der erforderlichen Konzentration erzwingt. Erst dann, wenn genügend FDP vorhanden ist, kann auch die Milchsäuregärung durchgeführt werden.

Bei S. aureus ist die Notwendigkeit eines FDP-Pools nicht gegeben. Dieser Stamm verfügt weder über eine FDP-aktivierbare LDH noch über eine FDP-aktivierbare Pyruvat-Kinase (Graf, 1976). Das Fließgleichgewicht der Glycolyse ist hier nicht gestört. Aus diesem Grund ist es nicht überraschend, daß bei diesem Organismus kein FDP-Pool nachgewiesen werden konnte (s.Tab.12).

Aber nicht nur die An- und Abwesenheit von Glucose im Wachstumsmedium sondern auch anaerobe und aerobe Wachstumsbedingungen beeinflussen den FDP-Pool und damit die Aktivität der L-LDH. Staphylokokken sind fakultativ anaerobe Bakterien. Sie veratmen Glucose, wenn genügend Sauerstoff vorhanden ist und vergären Glucose zu Milchsäure, wenn Sauerstoffmangel auftritt.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse mit einer nicht wachsenden Zellsuspension von S. epidermidis ATCC 14990

zusammengefaßt. Bei aerobem Glucoseabbau ist kein intrazellulärer FDP-Pool nachweisbar und es wird nur wenig L-Laktat in das Medium ausgeschieden. Unter anaeroben Bedingungen dagegen kommt es zur Ausbildung eines FDP-Pools und zur Anhäufung von extrazellulärem L-Laktat.

Man sieht aus diesen beiden Ergebnissen, daß der FDP-Pool eng mit der Milchsäuregärung gekoppelt ist.

Die Bedeutung der Regulation der L-LDH-Aktivität durch FDP liegt in der Einsparung von wertvollen Kohlehydraten, da die Gärung nur ein Zwanzigstel der Energie liefert, die durch Atmung gewonnen werden kann. Es wäre also unökonomisch, wenn neben der Atmung auch noch die Milchsäuregärung in vollem Umfang durchgeführt würde. Die Milchsäuregärung wird jedoch, unter aeroben Wachstumsbedingungen, über die Reduktion des FDP-Pools als Konkurrenzreaktion zur Atmung ausgeschaltet.

In Tabelle 13 wurde, auch der Einfluß von Oxamat auf den FDP-Pool untersucht. Oxamat ist ein kompetitiver Inhibitor der L-LDH. Wie die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, hemmt Oxamat nicht nur die L-Laktatbildung sondern auch die Ausbildung eines FDP-Pools. Wie ist letzteres zu erklären?

Zur Ausbildung einer erhöhten intrazellulären FDP-Konzentration wird ATP benötigt. Da jedoch in Anwesenheit von Oxamat die Milchsäuregärung gehemmt ist, kann ATP nicht so schnell nachgeliefert werden, wie zur Entstehung eines FDP-Pools notwendig wäre. Dies dürfte wohl der Grund sein, warum die Entstehung des FDP-Pools unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Oxamat verzögert ist.

Auch Acetat entsteht sowohl unter anaeroben wie unter aeroben Wachstumsbedingungen. Die Anhäufung von Acetat unter aeroben Bedingungen läßt vermuten, daß durch die Einschleusung von Pyruvat in den Citrat-Zyklus ein Engpaß entsteht. Dies wurde auch von Strasters und Winkler (1963) bei S. aureus-Stämmen beobachtet.

Die Bindung zwischen FDP und L-LDH

Alle bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Bindung zwischen FDP und L-LDH nicht besonders stabil ist. So läßt sich z.B. der Aktivierungsfaktor der L-LDH deutlich erhöhen, wenn man den zellfreien Extrakt auf 25°C erwärmt (s.Tab.7). Ferner wird durch Dialyse die L-LDH-Aktivität völlig FDP-abhängig, was man sich nur so erklären kann, daß FDP beim Dialysevorgang abdissoziiert wird. Und letztlich kann man aufgrund der unterschiedlichen Aktivitätszustände der isolierten L-LDH (s.Tab.12) schließen, daß die 'in vitro' gemachten Beobachtungen auch 'in vivo' gelten.

Eine lockere Bindung des Aktivators an die L-LDH ist durchaus sinnvoll, da ja in Abwesenheit des FDP-Pools die Aktivität der L-LDH gedrosselt werden soll.

Der FDP-Pool und die L-LDH-Aktivität

Bisher wurde angenommen, daß die intrazelluläre FDP-Konzentration - die bei anaerober Glucosefermentation gemessen wurde - ausreicht, um die L-LDH zu aktivieren. Die nachfolgenden Berechnungen zeigen, daß der FDP-Pool sogar sehr viel höher liegt, als zur maximalen Aktivierung der L-LDH notwendig ist.

Im allgemeinen kann man davon ausgehen, daß das bakterielle Trockengewicht aus rund 50 % Zellprotein besteht (Roberts et al., 1955). Porter (1946) fand, daß die Bakterienzelle während des Wachstums einen Wassergehalt von rund 80 % besitzt. Die Zellmasse während des Wachstums setzt sich dabei aus Trockengewicht und Wasser zusammen und wird als 'Zellnaßgewicht' bezeichnet.

Wie aus Tab.13 hervorgeht, erreicht die intrazelluläre FDP-Konzentration bei der anaeroben Glucosevergärung nach 60 Minuten eine Höhe von rund 40 nMol/mg Trockengewicht oder rund 80 nMol/mg Protein (s.Tab.12). Bei der Umrechnung dieser intrazellulären FDP-Konzentration unter Zugrundelegung der oben erwähnten Umrechnungsfaktoren ergeben sich 8 µMol FDP/g Zellnaßgewicht, was ungefähr einer 8 mM FDP-Lösung entspricht.

Um halbmaximale Aktivität der L-LDH von S.epidermidis zu erzielen, ist eine FDP-Konzentration von 0,15 mM notwendig (s.Abb.20 A). Man sieht also, daß eine intrazelluläre Konzentration von ca. 8 mM FDP ausreicht für optimale L-LDH-Aktivität.

Es wurde in diesem Zusammenhang auch die intrazelluläre Konzentration an anorganischem Phosphat getestet (s.Tab.12), da ja auch anorganisches Phosphat in sehr hoher Konzentration aktivierend auf die L-LDH wirkt. Aber die Phosphatkonzentration, die großemäßig der des FDP-Pools entspricht (etwa 10 mM), reicht bei weitem nicht aus, die L-LDH zu aktivieren und dürfte für die Regulation der L-LDH ohne physiologische Bedeutung sein.

Die Bedeutung der FDP-aktivierbaren LDH ist erst dann richtig zu erkennen, wenn man einen Vergleich mit jenen Organismen anstellt, deren LDH nicht durch FDP reguliert wird. Als Vergleichsorganismus bietet sich S. aureus ATCC 12600 an, dessen D- und L-LDH eingehender untersucht wurden.

S. aureus-Stämme, welche keine FDP-aktivierbare LDH besitzen, unterliegen ebenfalls einer sinnvollen Regulation, bei der die Gärung unter aeroben Wachstumsbedingungen gehemmt ist. So wurde gefunden, daß unter anaeroben Bedingungen 73-94 % der Glucose zu Laktat und 4-7 % zu Acetat abgebaut werden (Gardner und Lascelles, 1962; Strasters und Winkler, 1963). Unter aeroben Bedingungen sind jedoch CO_2 und Acetat die vorherrschenden Endprodukte und nur 5-10 % der Glucose erscheinen als Laktat. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die Milchsäuregärung in Gegenwart von Sauerstoff in irgendeiner Weise gehemmt sein muß.

Diese Regulation findet statt, trotzdem wir unter anaeroben wie unter aeroben Wachstumsbedingungen eine hohe LDH-Aktivität nachweisen konnten. Mit einer Reduzierung der Synthesegeschwindigkeit der LDH durch Sauerstoffeinfluß kann diese Regulation also nicht erklärt werden - wohl aber durch kinetische Daten der D- und L-LDH aus S. aureus ATCC 12600, die in Tab. 4 zusammengefaßt sind. Die K_m -Werte für Pyruvat liegen für die D- und L-LDH bei 0,35 mM bzw. 0,90 mM. Für D-Laktat beträgt der K_m -Wert 17 mM und für L-Laktat 45 mM. Bei beiden Enzymen ist die Affinität zu Pyruvat rund 50 mal höher als zu dem entsprechenden Laktatisomer. Die K_m -Werte von NAD^+ und NADH/H^+ sind bei beiden Enzymen gleich.

Bei einem Wechsel von anaeroben zu aeroben Wachstumsbedingungen wird die intrazelluläre Pyruvatkonzentration durch die Veratmung von Pyruvat und möglicherweise auch durch den

Ähnliche Werte wurden auch für Escherichia coli und Klebsiella aerogenes gefunden. Auffallend war bei diesen Untersuchungen, daß die NADH/H^+ -Konzentration unter anaeroben und aeroben Wachstumsbedingungen bemerkenswert konstant war. Die NAD^+ -Konzentration dagegen wies größere Schwankungen auf.

Die Hemmung der Milchsäuregärung unter aeroben Wachstumsbedingungen hängt damit zusammen, daß bei S. aureus die katalytische Reaktion der LDH reversibel ist. In Gegenwart von Sauerstoff werden durch Erniedrigung der intrazellulären Pyruvatkonzentration und der Erhöhung der NAD^+ -Konzentration Bedingungen geschaffen, die zu einem metastabilen Gleichgewichtszustand der LDH-Reaktion oder sogar zur Rückreaktion führen.

Anders liegen jedoch die Verhältnisse bei den FDP-aktivierbaren L-LDHs von S. epidermidis und S. intermedius. Bei keinem der in Tab. 15 aufgeführten Stämme konnte die FDP-aktivierbare L-LDH die Rückreaktion im optischen Test katalysieren, trotzdem die NAD^+ - und L-Laktatkonzentration im Testansatz sehr hoch war (s. MM 23.2.). Weiterhin konnte im Abschnitt 11.4.4. gezeigt werden, daß die Pyruvatreduktion mit L-Laktat nicht und mit NAD^+ nur dann, wenn es in einer hundertfach höheren Konzentration als NADH/H^+ vorliegt, gehemmt werden kann.

Dadurch, daß die FDP-aktivierbaren L-LDHs unter physiologischen Bedingungen eine irreversible Reaktion katalysieren - nämlich die Pyruvatreduktion - sind sie gegenüber den bei S. aureus erwähnten Regulationsmechanismen unempfindlich. Eine Erniedrigung der intrazellulären Pyruvatkonzentration führt zu keiner Hemmung der Milchsäuregärung, da die Rückreaktion (Laktat-oxidation) nicht katalysiert werden kann. Die Milchsäuregärung würde also trotz aerober Wachstumsbedingungen ungehindert weiterlaufen und eine Konkurrenzreaktion zur Atmung darstellen,

wenn die Aktivität der L-LDH nicht durch FDP reguliert wäre. Durch die Reduzierung des FDP-Pools unter aeroben Wachstumsbedingungen wird auch die L-LDH-Aktivität gehemmt und als Konkurrenzreaktion zur Atmung ausgeschaltet. (s. Abb. 31).

Diese Beispiele zeigen, daß die biologische Regulation der Milchsäuregärung unter anaeroben und aeroben Wachstumsbedingungen eng mit den kinetischen und allosterischen Besonderheiten der LDHs zusammenhängen.

Bakterien mit einer FDP-aktivierbaren L-LDH sind relativ weit verbreitet. Allerdings war die physiologische Bedeutung der FDP-aktivierbaren L-LDHs bisher nicht klar.

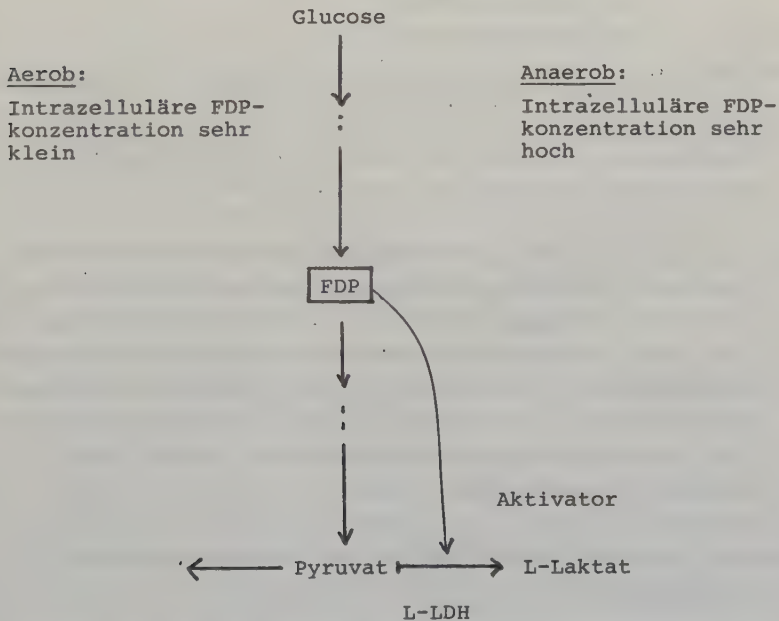


Abb. 31:

Der Einfluß von FDP auf Atmung und Gärung bei Staphylokokken mit einer FDP-aktivierbaren L-LDH.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden generell die biochemisch-physikalischen Merkmale der Laktatdehydrogenasen bei Staphylokokken und einigen Mikrokokken untersucht. Der Schwerpunkt der Arbeit jedoch wurde auf die FDP-aktivierbaren L-LDHs gelegt. Die folgenden Punkte geben einen kurzen Überblick der Ergebnisse:

- 1.) Die Staphylokokken lassen sich aufgrund des gebildeten Laktatisomers bei der Glucosevergärung in 3 Gruppen einteilen:

- a) D-Laktatbildner
- b) L-Laktatbildner
- c) D/L-Laktatbildner.

Die Bildung der verschiedenen Laktatisomere werden durch stereospezifische, NAD-abhängige D- oder L-Laktatdehydrogenasen katalysiert. Eine Laktat-Racemase konnte bei Staphylokokken nicht nachgewiesen werden.

- 2.) Die elektrophoretische Beweglichkeit der verschiedenen Laktatdehydrogenasen führte zu einer weiteren Unterteilung der Staphylokokkenarten. Dabei konnte gezeigt werden, daß aufgrund der gleichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit 3 L-LDH-Typen und 2 D-LDH-Typen vorkommen. Zur Absicherung der elektrophoretischen Beweglichkeit der verschiedenen Laktatdehydrogenasen wurden stets Koelektrophoresen durchgeführt.

- 3.) Ein Vergleich der D- und L-LDHs ergab wesentliche Unterschiede:

- a) Das Molekulargewicht der D-LDHs lag bei ca. 70.000 und das der L-LDHs bei rund 130.000 Daltons.

- b) Das pH-Optimum für die katalytische Aktivität lag bei den D-LDHs bei pH 5,0 und den L-LDHs bei pH 7.5.
 - c) Im Gegensatz zu den L-LDHs konnten die D-LDHs, durch Oxamat nicht gehemmt werden.
 - d) Weitere Unterschiede ergaben sich noch durch die unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten.
- 4.) Die FDP-aktivierbaren L-LDHs waren in ihren biochemisch-physikalischen Merkmalen relativ einheitlich. Das Molekulargewicht lag bei rund 130.000 Daltons und das pH-Optimum bewegte sich zwischen pH 5.0 und pH 5.5.

FDP ist ein essentieller Aktivator und ist notwendig, um die an sich labile LDH zu stabilisieren.

Die FDP-aktivierbare L-LDH aus S. epidermidis ATCC 14990 wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt und näher charakterisiert. FDP trug bei diesem Enzym zur Erhöhung der Hitzeresistenz und zur Stabilisierung der Tetramerstruktur bei.

Die Dialyse führte zu einer Dissoziation in Untereinheiten, die ein Molekulargewicht von 36.000 Daltons besitzen. Die Zugabe von FDP und NADH/H^+ zu einer dialysierten Enzymlösung führte zu einer Reassoziierung der Untereinheiten zum aktiven Tetramer. Neben FDP wurde die L-LDH auch noch bei hoher Phosphatkonzentration aktiviert. Die FDP-aktivierbare L-LDH wich in ihrem kinetischen Verhalten von der normalen MM-Kinetik ab. Für alle 3 Liganden (FDP, NADH/H^+ und Pyruvat) ergaben sich dabei n_{H} -Werte, die größer als 1 waren. Die intermediären Plateaus, die bei den Sättigungskurven auftraten, sprechen für einen Wechsel von positiver und negativer Kooperativität.

Der gravierendste Unterschied zu den nicht FDP-aktivierbaren L-LDHs bestand in der Unfähigkeit, unter physiologischen Bedingungen die Rückreaktion (L-Laktat $\rightarrow$ Pyruvat) zu katalysieren. L-Laktat war nicht in der Lage, die Pyruvatreduktion zu hemmen.

- 5.) FDP-Poolbestimmungen haben ergeben, daß der FDP-Pool nur unter anaeroben Wachstumsbedingungen nachzuweisen ist, nicht jedoch unter aeroben. Durch die An- und Abwesenheit eines FDP-Pools wurde auch die Aktivität der L-LDH sinnvoll koordiniert. War die Aktivität der L-LDH unter anaeroben Bedingungen (mit FDP-Pool) optimal, so war sie bei aeroben Bedingungen (ohne FDP-Pool) um das Zehnfache und mehr reduziert. Diese Ergebnisse ließen die physiologische Bedeutung der FDP-Regulation erkennen. Durch die Erniedrigung der intrazellulären FDP-Konzentration unter aeroben Wachstumsbedingungen wurde die Milchsäuregärung als Konkurrenzreaktion zur Atmung gehemmt.
- 6.) Die FDP-aktivierbaren L-LDHs zeichnen sich durch eine erhöhte elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit aus. Bei der Art S. intermedius ist diese Wanderungsgeschwindigkeit ein charakteristisches Merkmal.
- 7.) Neben S. epidermidis ATCC 14990 und S. intermedius-Stämmen konnte auch bei M. kristinae ATCC 27570 und M. varians CCM 884 eine FDP-aktivierbare L-LDH nachgewiesen werden. Sie unterscheiden sich in ihren biochemischen Merkmalen nicht wesentlich von den FDP-aktivierbaren L-LDHs der Staphylokokken. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit ist identisch mit der, die bei den FDP-aktivierbaren L-LDHs aus S. intermedius-Stämmen gefunden wurde.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Ainslie, G.R., Shill, J.P. and K.E. Neet: Transients and Co-operativity: A slow Transition Model for Relating Transients and Cooperative Kinetics of Enzymes. J.Biol. Chem. 247, 7088-7096 (1972).
- Andrews, P.: The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96, 595-605 (1965).
- Atkinson, D.E.: Regulation of enzyme activity. Ann. Rev. Biochem. 35, 85-124 (1966).
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. by R.E. Buchanan, N.E. Gibbons. 8. Auflage. Baltimore: Williams and Wilkins (1974).
- Bergmeyer, H.U., E. Bernt, F. Schmidt und H. Stork: D-Glucose, Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In H.U. Bergmeyer (Herausg.). Methoden der enzymatischen Analyse, 1241-1246 (1974).
- Bernt, E. und I. Gutmann: Äthanol, Bestimmung mit Alkohol-Dehydrogenase und NAD. In H.U. Bergmeyer (Herausg.). Methoden der enzymatischen Analyse, 1545-1548 (1974).
- Brown, A.T. und C.L. Wittenberger: Fructose-1,6-diphosphate-dependent lactate dehydrogenase from a cariogenic Streptococcus: Purification and regulatory properties. J.Bact. 110, 604-615 (1972).

- Bücher, T. und H.-J. Hohorst: D-Fructose-1,6-diphosphat, Dihydroxyacetonphosphat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat. In H.U.Bergmeyer (Hersg.). Methoden der enzymatischen Analyse, 1282-1288 (1966).
- Bühner, M. und H.Sund: Yeast Alcohol Dehydrogenase: -SH Groups, Disulfide Groups, Quaternary Structure, and Reactivation by Reductive Cleavage of Disulfide Groups. Europ. J. Biochem. 11, 73-80 (1969).
- Chan, W.W.-C. and K.Mosbach: Effects of Subunit Interactions on the Activity of Lactate Dehydrogenase Studied in Immobilized Enzyme Systems. Biochemistry 15, 4215-4222 (1976).
- Chen, P.S., T.Y. Toribara and H.Warner: Microdetermination of Phosphorus. Analyt. Chem. 28, 1756-1758 (1956).
- Cho, J.C. and H.Swaigood: Surface-bound lactate dehydrogenase: Preparation and study of the effect of matrix microenvironment on kinetic and structural properties. Biochim.Biophys. Acta 334, 243-256 (1974).
- Cuatrecasas, P.: Protein purification by affinity chromatography. J.Biol.Chem. 245, 3059-3065 (1970).
- Delory, G.E.: A note on the determination of phosphate in the presence of interfering substances. Biochem. J. 32, 1161-1162 (1938).
- Dennis, Don und N.O.Kaplan: Lactic Acid Racemization in Clostridium butylicum. Biochem. Zeitschr. 338, 485-495 (1963).

de Vries, W., and A.H.Stouthamer: Fermentation of Glucose, Lactose, Galactose, Mannitol, and Xylose by Bifidobacteria. J. Bact. 96, 472-478 (1968).

de Vries, W., Kapteijn, W.M.C., Van der Beek, E.G., and A.H. Stouthamer: Molar growth yields and fermentation balances of Lactobacillus casei L 3 in batch cultures and in continuous cultures. J. gen. Microbiol. 63, 333-345 (1970).

Dixon, M., and E.C.Webb: Enzymes. New York 1964.

Eggleston, L.V., and R.Hems: Separation of adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. Biochem. J. 52, 156-160 (1952).

Everse, J., and N.O.Kaplan: Lactate Dehydrogenase: Structure and Function. Advances in Enzymology (Editor A. Meister) 37, 61-133 (1973).

Frieden, C.: Kinetic Aspects of Regulation of Metabolic Processes. The Hysteretic Enzyme Concept. J. Biol. Chem. 245, 5788, 5799 (1970).

Gardner J.F., and J.Lascelles: The requirement for acetate of a streptomycin-resistant strain of Staphylococcus aureus. J. Gen. Microbiol. 29, 157-164 (1962).

Garrard, W., and J.Lascelles: Regulation of Staphylococcus aureus lactate dehydrogenase. J. Bacteriol. 95, 152-156 (1968).

Götz, F.: Biochemische Untersuchung der Laktatdehydrogenase bei Staphylococcus aureus 3528. Zulassungsarbeit. Universität München (1973).

- Götz, F. and K.H.Schleifer: Purification and Properties of a Fructose-1,6-Diphosphate Activated L-Lactate Dehydrogenase from Staphylococcus epidermidis. Arch.Microbiol. 105, 303-312 (1975).
- Graf, Fr.: Vergleichende biochemische Untersuchung der Pyruvat-kinasen von Staphylococcus aureus ATCC 12600, Staphylococcus epidermidis ATCC 14990, Streptococcus faecalis ATCC 8043 und Micrococcus kristinae ATCC 27570. Zulassungsarbeit. Universität München (1976).
- Green, A.A., and L.W.Hughes: Proteinfractionation on the Basis of Solubility in Aqueous Solutions of Salts and Organic Solvents. In S.P.Colowick and N.O.Kaplan (Hersg.). Methods in Enzymology Vol. I, 67-90 (1955). Academic Press Inc. Publishers, New York.
- Hajek, V.: Staphylococcus intermedius, a New Species Isolated from Animals. Int. J.Syst.Bacteriol. 26, 401-408 (1976).
- Hartree, E.F.: Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. Analyt. Biochem. 48, 422-427 (1972).
- Hiyama, T., Fukui, S., and K.Kitahara: Purification and Properties of Lactate Racemase from Lactobacillus sake. J. Biochem. 64, 99-107 (1968).
- Höpner, T. und J.Knappe: Formiat, Bestimmung mit Formiat-Dehydrogenase. In H.U.Bergmeyer (Hersg.). Methoden der enzymatischen Analyse. 1596-1600 (1974).
- Hohorst, H.J.: L-Lactatbestimmung. In H.U.Bergmeyer (Hersg.) Methoden der enzymatischen Analyse, 266-270 (1966).
- Holland, R., and G.G.Pritchard: Regulation of the L-lactate dehydrogenase from Lactobacillus casei by Fructose-1,6-diphosphate and metal ions. J.Bact.121, 777-784 (1975).

Holz, G. und H.U.Bergmeyer: Acetat, Bestimmung mit Acetatkinase und Hydroxylamin. In H.U.Bergmeyer (Hersg.). Methoden der enzymatischen Analyse, 1574-1578 (1974).

Hoo, R.: The effect of niacin and its analogs on the growth and on the nicotinamide coenzyme content of Staphylococcus aureus. PH.D. Dissertation, Loyola University of Chicago, 1971.

Jago, G.R., Nichol, L.W., O'Dea, K., and W.H.Sawyer: Physico-chemical studies on the lactate dehydrogenase of Streptococcus cremoris US3: The effect of modifiers. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 250, 271-285 (1971).

Jonas, H.A., Andres, R.F., and G.R.Jago: Factors affecting the activity of the lactate dehydrogenase of Streptococcus cremoris J.Bact. 111, 397-403 (1972).

Kloos, W.E., and K.H.Schleifer: Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis, Staphylococcus hominis and Staphylococcus simulans. Int. Syst. Bacteriol. 25, 62-79 (1975a).

Koshland, D.E.Jr., G.Nemethy, and D.Filmer: Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochemistry 5, 365-385 (1966).

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage.T4. Nature (Lond.) 227, 680-685 (1970).

Lauer, E.: Physiologische und biochemische Untersuchungen zur Taxonomie der Gattung Bifidobacterium Orla-Jensen 1924. Dissertation, Universität München (1974).

- Lehmer, A.: Vergleichende biochemische Untersuchung der NAD-abhängigen D-Lactatdehydrogenasen von Staphylococcus naemolyticus SM 131, Staphylococcus hominis DM 122 und Staphylococcus warneri AW 25. Diplomarbeit, Universität München (1975).
- Leloir, L.F., Olavarria, J.M., Goldberg, S.H., and H.Carminatti: Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. Arch. Biochem. Biophys. 81, 508-520 (1959).
- Leloir, L.F., and S.H.Goldberg: Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver. J.Biol. Chem. 235, 919-923 (1960).
- Levi, A.S.: Properties of Water-Insoluble Matrix-Bound Lactate-Dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 168, 115-121 (1975).
- Lineweaver, H. and D.Burk: The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934).
- Lovell, S.J. and D.J.Winzor: Effects of Phosphate on the Dissociation and Enzymic Stability of Rabbit Muscle Lactate Dehydrogenase. Biochemistry 13, 3527,3531 (1974).
- Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
- Maizel, J.V.Jr.: SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Science 151, 988-991 (1966).
- Mallette, M.F.: Evaluation of Growth by Physical and Chemical Means. In Norris, J.R. and D.W.Ribbons (Hersg.). Methods in Microbiology, 521-566 (1969). Academic Press, London and New York.

- Martin, R.G., and B.N.Ames: A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: Application to protein mixtures. *J.Biol.Chem.* 236, 1372-1379 (1961).
- Maurer, H.R.: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Berlin: de Gruyter, 1971.
- Monod, J., Wyman, J., and J.-P. Changeux: On the nature of allosteric transitions: A plausible model, *J.Mol.Biol.* 12, 88-118 (1965).
- Monod, J.: Zufall und Notwendigkeit. Deutscher Taschenbuch-Verlag GmbH u. Co., KG, München (1975).
- Mou, L., D.P.Mulvena, H.A.Jonas, and G.R.Jago: Purification and properties of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent D- and L-lactate dehydrogenases in a Group N *Streptococcus*. *J.Bact.* 111, 392-396 (1972).
- Neimark, H., und R.M.Lemcke: Occurrence and properties of lactic dehydrogenases of fermentative *Mycoplasmas*. *J.Bacteriol.* 111, 633-640 (1972).
- Neimark, H., und M.C.Tung: Properties of a fructose-1,6-diphosphate activated lactate dehydrogenase from *Acholeplasma laidlawii* Typ A. *J.Bact.* 114, 1025-1033 (1973).
- O'Carra, P., and S.Barry: Affinity chromatography of lactate dehydrogenase. *FEBS Letters* 21, 281-285 (1972).
- Passoneau, J.V., and O.Lowry: Phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 7, 10-15 (1962).
- Porter, J.R.: Bacterial Chemistry and Physiology. Wiley, New York (1946).

- Roberts, R.B., Abelson, P.H., Cowie, D.B., Bolton, E.T. und R.Britten: Studies of Biosynthesis in Escherichia coli. Carnegie Institute of Washington, Publication 607 (1955).
- Rose, J.A.: Acetate. In: Methods in Enzymology. (Ed.Colowick, S.P. and N.O.Kaplan) Vol.I, 591-594 (1955).
- Rudolph, R. und R.Jaenicke: Kinetics of Reassociation and Reactivation of Pig-Muscle Lactic Dehydrogenase after Acid Dissociation. Eur. J.Biochem. 63, 409-417 (1976).
- Sanwal, B.D.: Allosteric Controls of Amphibolic Pathways in Bacteria. Bact. Rev. 34, 20-39 (1970).
- Schleifer, K.H. und O Kandler: Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. Bacteriol. Rev. 36/4, 407-477 (1972).
- Schleifer, K.H., and M.Kocur: Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. Arch.Mikrobiol. 93, 65-85 (1973).
- Schleifer, K.H., and W.E.Kloos: Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus and descriptions of three new species: Staphylococcus cohnii, Staphylococcus haemolyticus, and Staphylococcus xylosus. Int.J.Syst.Bacteriol. 25, 50-61 (1975a).
- Schleifer, K.H., and W.E.Kloos: A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. J.Clin. Microbiol. 1, 337-338 (1975).

- Shapiro, A.L., E.Vinuella and J.V.Maizel: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 28, 815-820 (1967).
- Stetter, K.: Biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäureisomerenengemischen bei Lactobacillen. Dissertation, Technische Universität München (1973).
- Stockland, A.E., and C.L.San Clemente: Lactate dehydrogenase activity in certain strains of Staphylococcus aureus. *J.Bacteriol.* 95, 74-80 (1968).
- Stockland, A.E., and C.L.San Clemente: Multiple forms of lactate dehydrogenase in Staphylococcus aureus. *J.Bacteriol.* 100, 347-353 (1969).
- Stocklosa, J.T., and H.W.Latz: Molecular Weight Determination of Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate in Just the Sample Solution. *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 58, 74-79 (1974).
- Strasters, K.C. und K.C.Winkler: Carbohydrate Metabolism of Staphylococcus aureus. *J.Gen. Microbiol.* 33, 213-229 (1963).
- Sutherland, I.W., and J.F.Wilkinson: Chemical Extraction Methods of Microbial Cells. In Norris, J.R. and D.W.Ribbons (Hersg.). *Methods in Microbiology*, 345-383 (1971), Academic Press, London and New York.
- Talsky, G.: Zur anomalen Temperaturabhängigkeit enzymkatalysierter Reaktionen. *Angew.Chem.* 83, 553-594 (1971).
- Teipel, J. and D.E.Koshland, Jr.: The Significance of Intermediary Plateau Regions in Enzyme Saturation Curves. *Biochemistry* 8, 4656-4663 (1969).

- Weber, K. and M.Osborn: The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J.Biol.Chem. 244, 4406-4412 (1969).
- Wimpenny, J.W.T., and A.Firth: Levels of Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Facultative Bacteria and the Effect of Oxygen. J.Bacteriol. 111, 24-32 (1972).
- Wittenberger, C.L., and N.Angelo: Purification and Properties of a Fructose-1,6-Diphosphate-Activated Lactate Dehydrogenase from Streptococcus faecalis. J.Bact. 101, 717-724 (1970).
- Wolin, M J.: Fructose-1,6-Diphosphate Requirement of Streptococcal Lactic Dehydrogenases. Science 146, 775-777 (1964).

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Prof. Dr.K.H.Schleifer von 1974-1977 angefertigt.

Herrn Professor Schleifer danke ich für sein reges Interesse, seine vielseitigen Anregungen und seine wertvolle Unterstützung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern am Botanischen Institut der Universität München.

Insbesondere gilt mein Dank auch Herrn Dr. Stetter vom Botanischen Institut der Universität München und Herrn Dr. Wiegel vom Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen für ihre wertvollen Anregungen.

Lebenslauf

Am 25.5.1945 wurde ich, Friedrich Götz, als Sohn des Regierungsamtmannes Johannes Götz und seiner Frau Maria Götz, geb. Buchner, in Gangkofen geboren.

Von 1951-1955 besuchte ich die Volksschule in Staudach (Kreis Eggenfelden) und anschließend von 1955-1959 die Volksschule in München. 1959 trat ich in die 4-stufige Staatliche Mittelschule für Knaben und Mädchen in Gauting ein und legte dort 1963 die Abschlußprüfung ab.

Nach erfolgreicher Ablegung der Anstellungsprüfung für die Laufbahn des gehobenen Verwaltungsdienstes war ich von 1964 bis 1968 Städtischer Inspektoranwärter bei der Landeshauptstadt München. Am 11.3.1968 wurde ich zum Städtischen Inspektor zur Anstellung ernannt.

Noch während meiner Ausbildung als Städtischer Inspektoranwärter besuchte ich von 1965-1968 die Oberstufen-Förderlehrgänge an der Städtischen Abendrealschule München. Am 9.10.1968 legte ich im Bayerischen Staatsministerium für Unterricht und Kultus die Begabtenprüfung ab.

Im Wintersemester 1968 nahm ich das Studium des Faches Biologie und Chemie an der Universität München auf und legte nach dem 9. Semester im Herbst 1973 das Staatsexamen ab.

Ab Januar 1974 begann ich unter Anleitung von Professor Dr.K.H.Schleifer mit der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Vom 1.1.1974 bis 30.4.1976 hatte ich die Stelle einer wissenschaftlichen Hilfskraft bei der Ludwig Maximilians-Universität München inne. Seit 1.5.1976 bin ich als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München tätig.

Seit dem 3.12.1976 bin ich verheiratet.

